

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liis Mägi

**Naisepoolne viljatus: geeniregulatsiooni roll endomeetriumi vastuvõtlikkuse  
kujunemisel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Marina Suhorutšenko, M. Sc.  
Margit Nõukas, M. Sc.

TARTU 2015

## SISUKORD

LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1 VILJATUS .....	5
1.1.1 Naisepoolsed viljatuse põhjused .....	5
1.1.2 Mehepoolsed viljatuse põhjused .....	8
1.1.3 Viljatuse diagnostika .....	8
1.1.4 Viljatuse ravi .....	10
1.2 ENDOMEETRIUM .....	12
1.2.1 Morfoloogia.....	12
1.2.2 Viljastumine ja vastuvõtlik endomeetrium .....	15
1.2.3 Vastuvõtliku endomeetriumi tähtsus kunstlikul viljastamisel.....	17
1.3 ENDOMEETRIUMI VASTUVÕTLIKKUSE UURINGUD.....	18
1.3.1 Vastuvõtliku endomeetriumi molekulaarsed markerid .....	19
1.3.2 Geeniekspressiooni uuringud .....	21
2 EKSPERIMENTAALOSA .....	22
2.1 TÖÖ EESMÄRGID .....	22
2.2 MATERJAL JA METOODIKA .....	22
2.2.1 Valimi kirjeldamine ja endomeetriumi koeproovid .....	22
2.2.2 RNA eraldamine.....	22
2.2.3 cDNA raamatukogu koostamine ja RNA sekveneerimine.....	23
2.2.4 RNA sekveneerimisandmete analüüs.....	23
2.3 TULEMUSED .....	24
2.4 ARUTELU .....	25
KOKKUVÕTE .....	30
SUMMARY .....	31
TÄNUAVALDUSED.....	32
KIRJANDUSE LOETELU.....	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	42
LIHTLITSENTS.....	43

## LÜHENDID

ART	abistava reproduktsiooni meetodid ( <i>assisted reproductive technology</i> )
CAM	raku adhesiooni molekulid ( <i>cell adhesion molecule</i> )
cDNA	komplementaarne DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CSF-1	kolooniaid stimuleeriv faktor 1 ( <i>colony stimulating factor 1</i> )
E2	östradiol ( <i>estradiol</i> )
ERA	endomeetriumi retseptiivsuse kiip ( <i>endometrial receptivity array</i> )
FDR	valeavastuste määr ( <i>false discovery rate</i> )
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon ( <i>follicle-stimulating hormone</i> )
GO	geeniontoloogia ( <i>gene onthology</i> )
ICSI	spermi tsütoplasmaatiline injektsioon ( <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
IL-1	interleukiin 1 ( <i>interleukin 1</i> )
IUI	emakasisene viljastamine ( <i>intrauterine insemination</i> )
IVF	kehaväline viljastamine ( <i>in vitro fertilisation</i> )
LH	luteiniseeriv hormoon ( <i>luteinizing hormone</i> )
LIF	leukeemiat inhibeeriv faktor ( <i>leukemia-inhibitory factor</i> )
P4	progesteron ( <i>progesterone</i> )
PCOS	polütsüstiliste munasarjade sündroom ( <i>polycystic ovarian syndrome</i> )
PID	väikevaagna põletik ( <i>pelvic inflammatory disease</i> )
POF	enneaegne ovariaalpuudulikkus ( <i>premature ovarian failure</i> )
WOI	implantatsiooniaken ( <i>window of implantation</i> )

## SISSEJUHATUS

Viljatus ehk lastetus on meditsiiniline probleem, mille tõttu paaril ei ole õnnestunud rasestuda vähemalt aasta kestnud regulaarse ja kaitsmata suguelu jooksul. Viljatus on laialt levinud, seda esineb arenenud maades kuni 16,7% paaridest. Eestis on kuni 20 000 viljatut paari. Lastetus on umbes pooltel juhtudel põhjustatud naise viljatusest ning 35% juhtudel mehe viljatusest. Ülejäänud juhtudel on põhjused mõlemapoolsed või ei ole kindlat viljatuse põhjust tuvastatud.

Emaka limaskestas ehk endomeetriumis toimuvad igakuised tsüklilised muutused, et valmistada seda ette võimalikuks embrüo implantatsiooniks ehk pesastumiseks. Õnnestunud embrüo implantatsiooniks on vaja kompetentse embrüo ja vastuvõtliku endomeetriumi sünkroniseeritud suhtlust. Ebaõnnestunud implantatsiooni põhjuseks on 2/3 juhtudest mittevastuvõtlik endomeetrium. Viljatuse raviks saab kasutada *in vitro* viljastamist, kus kehaväliselt viljastatud embrüo siirdatakse naise emakaõõnde. Siirdatud embrüote implanteerumise efektiivsus on aga kõigest 25%. Seetõttu on vastuvõtlikul endomeetriumi väga tähtis roll raseduse säilitamisel.

Viljatusravi tulemuste parandamiseks on oluline mõista, millised protsessid ning molekulid osalevad vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ning implantatsioonil. Endomeetriumi geeniekspressiooni uuringutest on selgunud, et geeniekspressiooni profiil muutub menstruaaltsükli eri faasides. Analüüsides geeniekspressiooni vastuvõtlikus endomeetriumis on võimalik leida geene, mis osalevad selle kujunemisel ning leida biomarkereid, mida saab kasutada retseptiivse endomeetriumi diagnoosimisel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida endomeetriumi koe geeniekspressiooni RNA sekveneerimise abil ning leida geene, mille ekspressioon muutub endomeetriumi vastuvõtlikus faasis, ja mida saaks kasutada võimalike biomarkeritena endomeetriumi vastuvõtlikkuse hindamisel. Antud uurimistöö viidi läbi AS Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuses.

Märksõnad: viljatus, endomeetriumi vastuvõtlikkus, geeniekspressioon, RNA sekveneerimine.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 VILJATUS

Viljatus ehk infertiilsus puudutab maailmas hinnanguliselt kuni 15% paaridest (Boivin jt, 2007). Viljatuseks nimetatakse olukorda, kus paaril ei ole õnnestunud rasestuda vähemalt aasta jooksul vaatamata regulaarsele ja kaitsmata suguelule (Jose-Miller jt, 2007). Viljatus on sagenev probleem ning Eestis on ligikaudu 15 000 – 20 000 viljatut paari (Haller-Kikkatalo jt, 2009; Kalinina ja Matt, 2003). Eristatakse primaarset ja sekundaarset viljatust. Primaarse viljatuse korral ei ole naine kunagi lapseootele jäänud. Sekundaarse viljatuse puhul ei ole naine varasema elussünni järgselt enam rasestunud või eluvõimelist last sünnitanud (Mascarenhas jt, 2012).

Paari lastetus on umbes pooltel juhtudel põhjustatud naise viljatusest ning 35% juhtudel mehe viljatusest (Fritz ja Speroff, 2011). Paari viljatusprobleemid võivad olla tingitud ka mõlemast partnerist. Umbes 15% juhtudest ei tuvastata kindlat viljatuse põhjust (Gelbaya jt, 2014). Sellisel juhul on tegemist seletamatu ehk idiopaatilise viljatusega, mis võib olla tingitud näiteks patoloogilistest muutustest naise organismi immuunvastuses, oksüdatiivsest stressist, munaraku anomaaliatest või implantatsioonihäiretest (Ray jt, 2012; Ylikorkala jt, 2008; Van Voorhis jt, 1997).

Inimese psüühikat ning kooselu partneriga mõjutavad negatiivselt lastetusega kaasnev kurbustunne, depressioon ning ühiskonna kriitiline suhtumine (Nagy jt, 2015). Eesti ja teiste arenenud maade kahaneva ja vananeva rahvastiku juures on viljatus oluline probleem. Seoses negatiivse iibe ja esmas- ning korduvsünnitajate tõusuga suureneb vajadus abistava reproduktiivmeditsiini tehnoloogiate (ART – *assisted reproductive technology*) ja teiste viljatusravi meetodite järele. Kuigi vastavalt kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seaduses sätestatud tingimustele ART protseduurid hüvitatakse, on piiratud ressursside tõttu oluline muuta viljatusravi senisest efektiivsemaks (Lapp, 2013; Kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seadus, 1997).

### 1.1.1 Naisepoolsed viljatuse põhjused

Naise viljakust mõjutab suurel määral vanus (Templeton jt, 1996). Viljakus hakkab tunduvalt langema pärast 35. eluaastat – lastetuse sagedus 30-35-aastaste seas on 16%, kuid 40-45-aastastel 40% (de la Rochebrochard jt, 2002; Ylikorkkala jt, 2008). Vanuse mõju viljakusele

sõltub kolmest tegurist: (i) organismi loomulik vananemine, (ii) läbipõetud haiguste ning traumade kumulatiivne mõju reproduktiivsüsteemile ning (iii) elukeskkond ja sotsiaalsed ning majanduslikud tegurid. Näiteks on arenenud riikides paranenud rasestumisvastaste vahendite kättesaadavus ja keskendutakse karjäärile, mille tõttu lapse saamise peale mõeldakse hilisemas eas (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Vanuse kasvades aga väheneb munasarjade funktsioon ning reserv, mille tõttu on raskem rasestuda. Looteas on munasarjades kuni seitse miljonit ootsüüti, kuid esimese menstruatsiooni ehk menarhe alguseks on nende arv 300 000 (Maroulis, 1997). Menarhest kuni menopausini valmib ning ovuleerub umbes 400 munarakku ning 40. eluaastaks on munarakkude reserv kahanenud 25 000-ni (Vaskivuo jt, 2001). Samuti väheneb munarakkude kvaliteet, näiteks esineb tihemini kromosoomide arvu muutusi (Macas jt, 1990).

Umbes 25% juhtudest on naisepoolse viljatuse põhjuseks ovulatsioonihäired ehk ovulatsioonide ebaregulaarne esinemine või puudumine (Unuane jt, 2011). Ovulatoorsete häirete puhul on oluline hüpotalamuse-ajuripatsi-ovariaalse süsteemi koordineeritud regulatsioon (ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Hüpotalamusest erituv luteiniseerivat hormooni vabastav hormoon seondub retseptoritega ning põhjustab biokeemiliste reaktsioonide kaskaadi. Selle tulemusena hakatakse tootma luteiniseerivat hormooni (LH – *luteinizing hormone*) ning folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH – *follicle-stimulating hormone*). LH ja FSH vabanevad vereringesse ning seonduvad munasarjas olevate retseptoritega, mis stimuleerivad östradioli (E2 – *estradiol*) ja progesterooni (P4 – *progesterone*) tootmist. Sõltuvalt menstruaaltsükli faasist avaldab E2 ja P4 sisaldus organismis hüpotalamusele ja ajuripatsile positiivset või negatiivset tagasisidet (Kanis ja Stevenson, 1994). Selle süsteemi häirimisel tekivad muutused hormonaalses tasakaalus, mis võivad põhjustada anovulatoorseid menstruaaltsükleid (ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Suurenenud LH ja FSH tase on iseloomulik hüpergonadotroopse hüpogonadismile, mille näiteks on enneaegne ovariaalpuudulikkus (POF – *premature ovarian failure*), kus normaalne munasarja funktsionaalsus lõppeb alla 40. aasta vanustel naistel enneaegse munasarja folliikulite vähenemise tõttu. POF-i iseloomustab ka menstruatsiooni puudumine või kadumine (Unuane jt, 2011). Kui FSH ja LH sekretsioon on vähenenud, on tegemist hüpogonadotroopse hüpogonadismiga, mis on seotud suure kehakaalu langusega, Kallmanni sündroomi või hüperprolaktineemiaga (ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Ovulatsioonihäiretega naistel esineb kõige tihemini normogonadotroopset anovulatsiooni, kuhu kuulub ka polütsüstiliste munasarjade sündroom (PCOS – *polycystic ovarian syndrome*).

PCOS-i iseloomustavad polütsüstilised munasarjad, anovulatsioonist või oligo-ovulatsioonist põhjustatud oligomenorröa või amenorröa, suurenenud androgeenide sünteesist põhjustatud hüperandrogenism (ka hirsutism) ja insuliiniresistentsus (Teede jt, 2010).

Munajuhade ehk tubaarse viljatuse korral on häiritud munajuha normaalne funktsioon. Takistatud on seemnerakkude ligipääs munarakuni selle viljastamiseks või viljastatud munaraku liikumine emakasse (Seracchioli jt, 1997). Tubaarne viljatus võib tekkida kirurgiliste protseduuride ja endometrioosi tagajärjel. Kõige sagedasem tubaarse viljatuse põhjustaja on väikevaagna põletik (PID – *pelvic inflammatory disease*), mis suurel osal juhtudest on põhjustatud *Chlamydia trachomatis*'e ja *Neisseria gonorrhoeae* tekitatud sugulisel teel levivate bakteriaalsete infektsioonide, vastavalt klamüüdia ja gonorröa, tüsistusest (Edmonds, 2012). PID võib viia endometriidi ja munajuhasiseste liidete tekkimiseni, munajuha valendiku sulgumiseni või munajuha seina kahjustusteni. Seetõttu ei ole võimalik munarakku transport emakasse ja selle viljastumine või implantatsioon. Munajuhade kahjustuse tõttu võib esineda ka emakaväline rasedus (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

Endometrioos on östrogeenist sõltuv günekoloogiline haigus, mille esinemissagedus reproduktiivses eas naistel on 10-20%. Endometrioosi puhul asub ja talitleb endomeetriumi sarnane kude väljaspool emakaõõnt. Endometrioosi koldeid iseloomustab endomeetriumi strooma- ja epiteelirakkude esinemine, kõhuõõnde valguv veri ja põletikulised reaktsioonid (Bulun, 2009). Endometrioosi kolded asuvad sagedamini munasarjadel, kõhu- ja vaagnakelmel, aga ka munajuhadel, emakakaelal, põiel (Ylikorkala jt, 2008). Haiguse peamiseks sümptomiks on alakõhuvalud. Neid võib põhjustada sekundaarne düsmenorröa ehk valulikkus menstruatsiooni ajal, valulik suguühe (düspareunia) ja krooniline vaagnavalu (Simoens, 2012). Endometrioosiga võib kaasneda ka viljakuse vähenemine või viljatus, mida põhjustavad põletikulised protsessid endometriosikolletes. Seetõttu võib väheneda endomeetriumi vastuvõtlikkus, kahjustuda munajuhade funktsioneerimine ning munaraku ja embrüo areng ja väheneda implantatsioonimäär (Fadhlaoui jt, 2014).

Emakaõõnes võib esineda patoloogiaid ning anomaaliaid, mis takistavad embüo kinnitumist emaka limaskestale. Emaka ehitusanomaaliteks on näiteks emaka osaline või täielik vahesein ning emaka kaheosalisus. Emakaõõnes võib esineda ka polüüpe, müoomisõlmi ja liiteid, mis võivad häirida embrüo pesastumist või platsenta moodustumist. Samuti on suurenenud spontaanse aborti oht (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Emakasiseste liidete

põhjus võib olla ka Ashermanni sündroom, mida iseloomustavad emakasisesed armid ja liited, mis on tekkinud endomeetriumi trauma tagaärjel vallanduvate normaalsete haavaparanemise protsesside tõttu. Endomeetriumi traumad võib põhjustada näiteks kirurgiline abort või ka endomeetriumi põletik. Armide ja liidete tõttu ei pruugi emakalimaskest östrogeeni mõjutustele vastata, tihti esineb haigetel menstruaaltsükli häireid ja ka viljatust (March, 1995; Klein ja García, 1973).

Autoimmuunseid mehhanisme ning ka mitmete autoantikehade suurenenud produktsiooni seostatakse erinevate viljatuse põhjustega (Reimand jt, 2001). Viljatutel naistel on täheldatud erinevate autoantikehade esinemist. Näiteks on leitud suurenenud anti-ovariaalsete antikehade esinemist PCOS-i ja POF-iga naistel (Kelkar jt, 2005). Endometrioosiga haigetel on täheldatud endomeetriumi vastaste antikehade esinemist. Antifosfolipiid-antikehi on seotud seletamatu viljatuse ning implantatsioonihäiretest tingitud korduva raseduse katkemisega (Sarapik jt, 2010).

### **1.1.2 Mehepoolsed viljatuse põhjused**

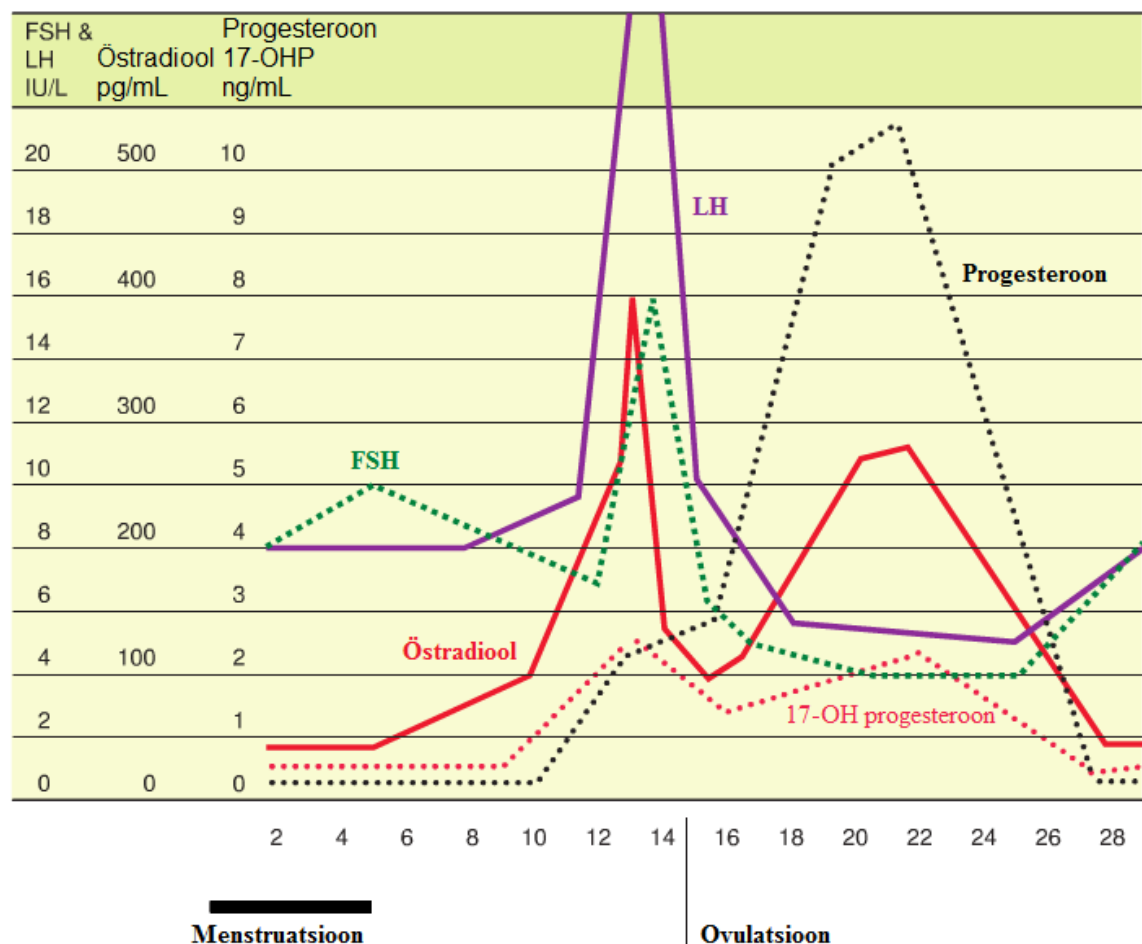
Meestel põhjustavad viljatust erinevad kaasasündinud ja omandatud haigused ning geneetilised hälbed, näiteks prostatiit, krüptorhism, varikotseele ja kromosoomi anomaaliad (Krausz, 2011). Veel mõjutavad mehe viljatust eluviis ja keskkonnategurid – suitsetamine, alkohol, temperatuur, kemikaalid, stress, kiirgus (Li jt, 2011). Need haigused ja tegurid põhjustavad muutusi seemnerakkude kvaliteedi parameetrites – seemnerakkude hulgas ja kontsentratsioonis, liikuvuses ning morfoloogias (Jungwirth jt, 2012). Samuti võib seemnerakkude kvaliteedi parameetreid, DNA terviklikkust ja mutatsioonide teket mõjutada mehe vananemine (Brehm jt, 2011; Moskovtsev jt, 2006; Agaewal jt, 2008). Need parameetrite muutused võivad vähendada viljakust, põhjustada kaasasündinud sünnidefekte ja spontaanseid aborte (Alio jt, 2012; Sharma jt, 2015).

### **1.1.3 Viljatuse diagnostika**

Paari lastetus võib olla naise-, mehe- või mõlemapoolne, mistõttu on erinevate uuringute teostamine vajalik mõlemale partnerile (Ylikorkala jt, 2008). Enne põhjalikemate uuringute läbiviimist on vajalik saada ülevaade mõlema partneri üldtervise seisundist. Naise viljakuse uurimisel viiakse kõigepealt läbi vestlus, mille käigus esitab arst patsiendile küsimusi üldise tervisliku seisundi, menstruaaltsükli, kahjulike harjumuste, seksuaalelu, läbipõetud haigust,



varasemate raseduste ning varem viljatusega seoses teostatud uuringute ja ravi ning praeguste kaebuste kohta. Samuti on diagnoosimisel väga oluline perekonna haigusloo uurimine, et teada, kas suguvõsas on esinenud sünnidefekte, varajast menopausi või reproduktiivprobleeme. Günekoloogilisel läbivaatusel kontrollitakse tupe ja emakakaela seisundit ning vooluse esinemist. Suguteede põletike kindlaks tegemiseks võetakse tupest külvid. Ovulatoorseid häired on võimalik diagnoosida vaadates menstruaaltsüklite ajalugu ning mõõtes LH, FSH ja progesterooni ja östradiooli kontsentratsiooni. Folliikulite arengut saab jälgida korduval ultraheliuuringul (The Practice Committee of the ASRM, 2015). Emakaõõnt, munasarjasid ning munajuhaid saab uurida sonosalpingograafia ning transvaginaalse ultraheli abil. Võimalik on hinnata ka munajuhade läbitavust, emakaõõne kuju ning munasarjade anatoomiat ja paiknemist. Invasiivsemad protseduurid on hüsteroskoopia ja laparoskoopia. Hüsteroskoopia käigus uuritakse emakaõõnt ning kui leitakse polüüpe, liiteid või fibroide on need võimalik samaaegselt eemaldada. Laparoskoopiaga on võimalik näha ja eemaldada väikeses vaagnas olevaid liiteid, samuti kontrollida munajuhade läbitavust (Ylikorkala jt, 2008).



**Joonis 1. Hormoonide kontsentratsioon menstruaaltsüklis** (Fritz ja Speroff, 2011) järgi. Joonisel on näidatud viljatuse diagnostikas oluliste hormoonide tase menstruaaltsükli jooksul.

On teada, et eluviis võib mõjutada viljakust, mistõttu on oluline enne viljatusravi alustamist vaadata üle patsiendi elustiili valikud (The Practice Committee of the ASRM, 2008). Kuna nii üle- kui ka alakaal võivad põhjustada ovulatsioonihäireid ja menstruaalfunktsiooni kadumist, tuleks kehakaal normaliseerida ning selle tulemusel võib ka taastuda menstruaaltsükkel ning paraneda viljatusravi tulemused (Ylikorkala jt, 2008; Bellver jt, 2013). Suitsetavate naiste seas on viljatuse esinemine suurem ning rasestumismäär väiksem (Hull jt, 2000). Samuti vähendab suitsetamine viljatusravi meetodite edukust – suitsetavatel naistel on suurem spontaanse abordi tõenäosus (Waylen jt, 2009). Lisaks võib viljakust ning viljatusravi tulemuslikkust vähendada sage või tugev alkoholi tarbimine, mida on seostatud anovulatsiooni ja vähenenud implantatsiooni võimega (Gill, 2000; Tolstrup jt, 2003).

#### **1.1.4 Viljatuse ravi**

Viljatuse ravis kasutatakse abistava reproduktsiooni meetodeid (ART), kus raseduse saavutamise eesmärgil teostatakse inimese muna- ja seemnerakkudega erinevaid *in vitro* protseduure ja meetodeid (Zegers-Hochschild jt, 2009).

*In vitro* viljastamine (IVF – *in vitro fertilisation*) ehk kehaväline viljastamine on esimene kasutuselevõetud ART meetod ja kõige laialdasemalt praktiseeritud kunstliku viljastamise protseduur (Fritz ja Speroff, 2011). Esimene kehavälise viljastamise abil saadud laps sündis 1978. a Inglismaal, 1995. aastal sündis Eestis esimene Baltimaade IVF laps (Steptoe ja Edwards, 1978; Sõritsa jt., 1997). Maailmas on ART meetodite abil sündinud hinnanguliselt üle viie miljoni lapse (Biggers, 2012).

IVF-i protseduuri esimeses etapis teostatakse naisele hormonaalne ravikuur, mille tulemusena stimuleeritakse mitmete munarakkude üheaegset küpsemist (Zegers-Hochschild jt, 2009). Tavaliselt kasutatakse munasarja stimulatsiooniks gonadotropiini vabastavat hormooni (GnRH), selle analooge või agoniste (Edwards, 2005). Seejärel kogutakse munarakud ultrasonograafia kontrolli all tupe kaudu tehtava munasarja punktsiooniga (Biggers, 2012). Viljastamiseks eraldatakse seemnevedelikust kõige viljastamisvõimelisemad spermid, igat munarakku inkubeeritakse 50 000. – 100 000. eelnevalt töödeldud spermiga 12-18 h. Kolmandal päeval pärast viljastamist valitakse kuni kolm kvaliteetset embrüot ning siirdatakse emakasse. Siirdamisest üle jäänud embrüod võib külmutada ja säilitada külmutatuna kuni seitse aastat (Fritz ja Speroff, 2011; Kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seadus, 1997). Raskemate sprema patoloogiate puhul on võimalik koos IVF-iga kasutada

seemneraku intratsütoplasmaatilist injektsiooni (ICSI – *intracytoplasmic sperm injection*), kus seemerakk süstitakse otse munarakku (Fritz ja Speroff, 2011).

IVF meetod arendati algselt välja tubaarse viljatuse raviks, kuid see on edukalt rakendatav väga erinevate viljatuse põhjuste puhul. Meetodi tulemuslikkus on ligikaudu 30%, korduvat IVF-i ebaõnnestumist naispartneril seostatakse emakaõõne patoloogiate, ebapiisava endomeetriumi tiheduse ja immuunprobleemide tõttu vähenenud endomeetriumi vastuvõtlikkusega (Ferraretti jt, 2012; Margalioth jt., 2006).

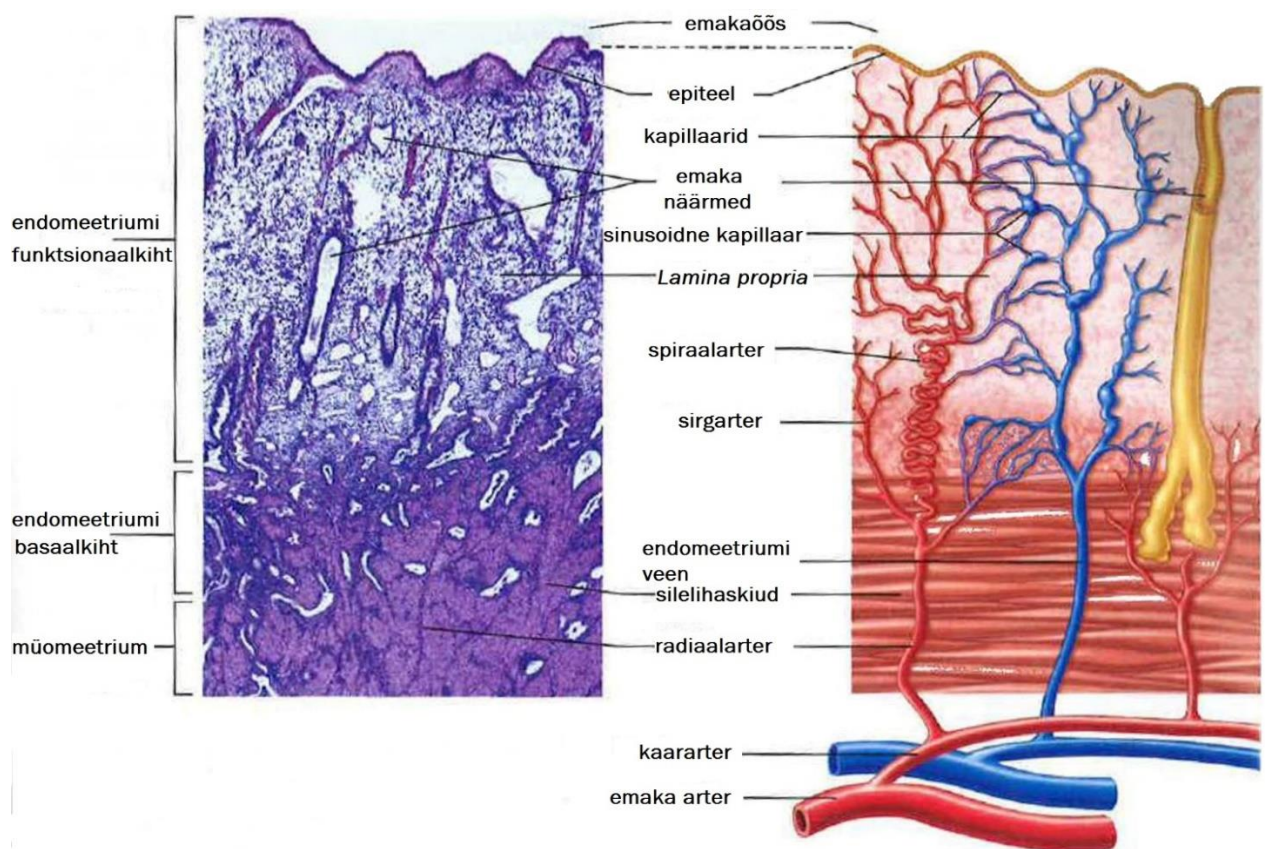
Intrauteriinne inseminatsioon (IUI – *Intrauterine Insemination*) on meetod, mille käigus viiakse töödeldud sperma peenikese kateetri abil emakaõõnde. Protseduur toimub loomuliku või stimuleeritud ovulatsiooni ajal ning juhul, kui naise munajuhad on läbitavad. IUI näidustusteks on halvenenud sperma kvaliteet, vähenenud ejakulaadi hulk ning seletamatu viljatus (Ylikorkala, 2008). IUI meetodit ei loeta ART tehnoloogiate hulka, kuid see on odavam ning vähem invasiivne, kui teised ART meetodid (Tournaye, 2012).

Ovulatsioonihäireid ravitakse tavaliselt medikamentooselt. Klomifeentsitraat on kõige tavalisem ovulatsiooni induktsiooniks kasutatav ravim, gonadotropiinraviga saab stimuleerida munasarjade funktsiooni. Operatiivset ravi kasutatakse endometrioosi, emakaõõne patoloogiate ja munajuhade kahjustuste puhul (Jose-Miller jt, 2007). Protseduur teostatakse sageli laparoskoopiliselt ning selle käigus on võimalik taastada munajuhade läbitavus ja eemaldada endometrioosikoldeid ja -liiteid (Forti ja Krausz, 1998).

## 1.2 ENDOMEETRIUM

### 1.2.1 Morfoloogia

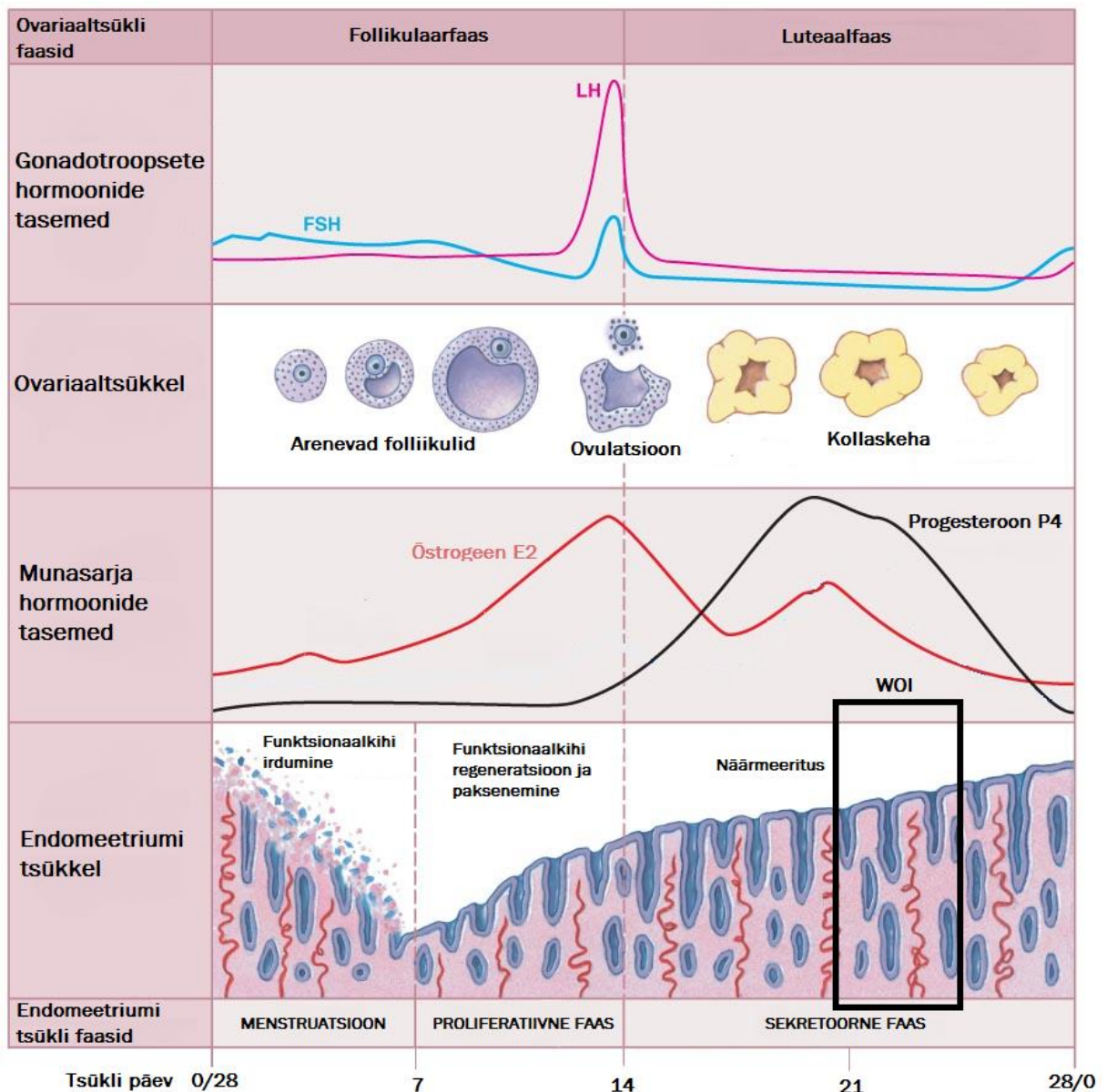
Endomeetrium ehk emakalimaskest on emakaõõne sisepinda kattev limaskest. See on suure regeneratsioonivõimega ning koosneb ühekihilisest silinderepiteelist ning selle all olevast sidekoest. Lihttubuloossed emakanäärmed ulatuvad endomeetriumi pinnalt sidekoesse, kus asetsevad ka spiraalarterid (Spencer jt, 2005). Viljakas eas naistel jaguneb endomeetrium morfoloogiliselt kaheks kihiks, pindmiseks ehk funktsionaalkihiks (*stratum functionale endometrii*) ja süva- ehk basaalkihiks (*stratum basale endometrii*). Need erinevad nii struktuuri kui ka funktsiooni poolest (Ross ja Pawlina, 2011).



**Joonis 2. Läbilõige endomeetriumi koest** (Marieb ja Hoehn, 2010) järgi. Vasakpoolsel pildil on 40x suurendusega endomeetriumi koe pikilõik, nähtavad on endomeetriumi funktsionaal- ja basaalkiht ning osaliselt müomeetrium. Parempoolsel pildil on kujutatud endomeetriumi skeem.

Erinevate endomeetriumi rakkude geeniekspressiooni reguleerivad peamiselt munasarja steroidhormoonid östradiol (E2) ja progesteron (P4) ning parakriinselt sekreteeritud molekulid naaberrakkudest. Sellise regulatsiooni tõttu toimuvad endomeetriumis igakuised tsüklilised muutused, mis moodustavad 28-päevase menstruaaltsükli (Ruiz-Alonso jt, 2012).

Muutused funktsionaalkihis võib jagada kolme faasi: proliferatiivne faas, sekretoorne faas ja menstruaalfaas. Tsükli proliferatiivses faasis toimub E2 mõjul peamiselt DNA sünteesi ning rakujagunemisega seotud geenide aktivatsioon (Lessey, 2010). Toimub funktsionaalkihi regeneratsioon ja paksenemine ning tekivad veresooneid ning näärmed (Ponnampalam jt, 2004). Basaalne kiht on funktsionaalkihi taastumise allikas (Ross ja Pawlina, 2011). Proliferatiivse faasi lõpus toimub küpse munaraku vabanemine munasarja folliikulist ehk ovulatsioon ning kollaskeha moodustumine. Sekretsioonifaasis avalduvad geenid, mis on seotud koe diferentseerumisega (Lessey, 2010). Algab näärmeeritus, endomeetriumis asuvad stroomarakud laienevad, moodustuvad spiraalarterid, tekivad glükogeenipõiekesed ning tiheneb veresoonte võrgustik (Ylikorkala ja Kauppila, 2008). Kui rasedust ei teki, langeb E2 ja P4 tase organismis, mis viib funktsionaalkihi irdumiseni menstruaalfaasis (Ponnampalam jt, 2004).

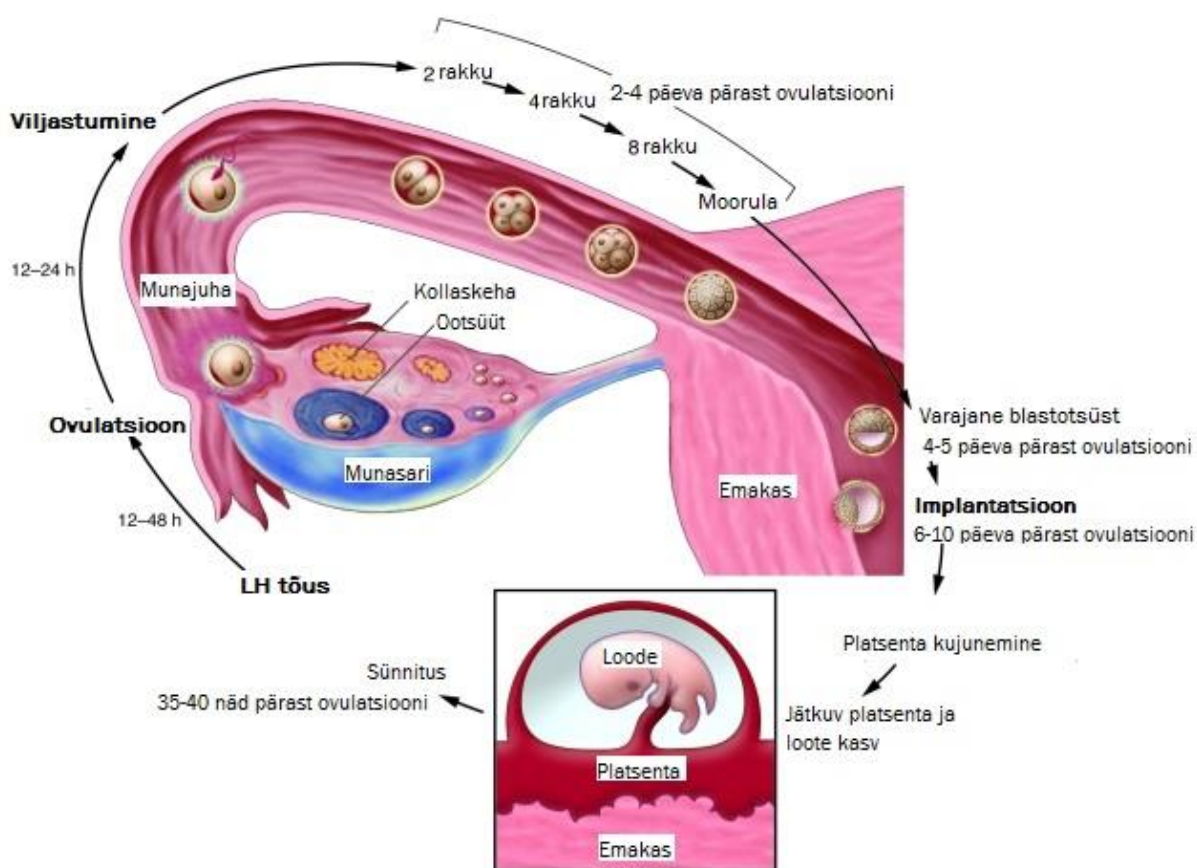


**Joonis 3. Menstruaaltsükli faasid ja hormonaalne regulatsioon** (Martini jt, 2013) järgi. Menstruaaltsükkel algab endomeetriumi funktsionaalkihi irdumise ehk menstruatsiooniga. E2 toimetel toimub proliferatiivses faasis funktsionaalkihi regeneratsioon. Katkendliku vertikaaljoonega on tähistatud küpse munaraku vabanemine munasarjafolliikulist ehk ovulatsioon. Sekretsioonifaasis toimub tekkinud kollaskeha poolt toodetud P4 toimetel endomeetriumi diferentseerumine ja embrüo võimalikuks implantatsiooniks ette valmistamine. Kui rasestumist ei toimu, langeb P4 ja E2 tase, mis põhjustab endomeetriumi koe lagunemise ning see irdub (Lessey, 2010; Tamm jt, 2012).



## 1.2.2 Viljastumine ja vastuvõtlik endomeetrium

Igakuised tsüklilised muutused toimuvad selleks, et valmistada emakalimaskesta ette võimalikuks embrüo implantatsiooniks ehk pesastumiseks emaka limaskestale ehk endomeetriumile. Implantatsiooni tulemusena on blastotsüst seotud ema endomeetriumiga ning saab moodustuda platsenta, mis on ühenduslüli ema ning kasvava embrüo vahel (Achache ja Revel, 2006). Õnnestunud embrüo implantatsiooniks on vaja kompetentse embrüo ja vastuvõtliku endomeetriumi sünkroniseeritud suhtlust (Cha jt, 2012). Ebaõnnestunud implantatsiooni põhjuseks on 2/3 juhtudest mitteretseseptiivne endomeetrium ning vaid 1/3 kordadest vigane embrüo (Simon jt, 1998; Lédée-Bataille jt, 2002).



**Joonis 4. Inimese raseduse ajaline järjestus** (Dey, 2010) järgi. Joonisel on kujutatud ajaline järjestus, mis põhineb 28.-30. päeval menstruaaltsükli. LH taseme tõus stimuleerib ovulatsiooni 13-14. tsükli päeval. *Corpus luteum* ehk kollaskeha tekib lõhkenud munasarjafolliikulist ning hakkab tootma P4. P4 mõjul toimuvad muutused, et endomeetrium oleks vastuvõtlik embrüo kinnitumiseks, kui viljastumine on toimunud. Munaraku viljastamine seemnerakuga toimub munajuhas, seejärel liigub viljastatud munarakk emakasse. Liikumise käigus viljastatud munarakk jaguneb. 6-8 päeva pärast ovulatsiooni implanteerub ehk pesastub blastotsüsti staadiumis embrüo endomeetriumile.

Kuigi blastotsüst võib kinnituda erinevatele inimese kudedele, on emakalimaskestale kinnitumise aeg piiratud. Nelja päeva pikkust perioodi, mil emakalimaskest on kõige vastuvõtlikum embrüo kinnitumiseks, nimetatakse implantatsiooniaknaks (WOI – *window of implantation*). See on ajavahemik, mille jooksul emaka keskkond võimaldab embrüol implanteeruda. Implantatsiooniaken esineb regulaarse menstruaaltsükli 20. kuni 24. päeval, mis on 6-10 päeva pärast ovulatsiooni ning 7-11 päeva pärast LH eritumise maksimumi (Achache ja Revel, 2006). WOI algab ja lõppeb vastavalt 6 ja 9-10 päeva pärast progesterooni toime algust (Nikas, 2000). Implantatsiooni võimaldamiseks toimuvad emakalimaskestas mitmed implantatsiooniakent iseloomustavad muutused.

72-96 tundi pärast viljastumist siseneb moorula staadiumis embrüo emakaõõnde, kus ta jätkab jagunemist. Seejärel kujuneb dialoog vastuvõtliku endomeetriumi ning nüüdseks blastotsüüdi staadiumis embrüo vahel, mida vahendavad hormoonid ja kasvufaktorid. Selle tulemusel on blastotsüst emakaseina suhtes õigesti orienteeritud (appositsioon) ning ta kinnitub endomeetriumi epiteelile (adhesioon). Seejärel tungib blastotsüst immuunrakkude, tsütokiinide, kasvufaktorite, kemokiinide ja adhesioonimolekulide vahendusel endomeetriumi kihtidesse (invasioon). Nende protsesside toimumiseks on vaja, et endomeetriumis oleks kohane koordineeritud geeniekspressiooni regulatsioon kogu tsükli jooksul (Ruiz-Alonso jt, 2012).

Sekretsioonifaasi keskel algab emakalimaskesta predetsidualisatsioon. Limaskest pakseneb ja selle veresoonte võrgustik tiheneb. Näärmed on väänlevad ja näärmeerituse aktiivsus suureneb (Sharma ja Kumar, 2012). Veresoonte ümber olevaid stroomarakke ümbritseb peritsellulaarne maatriks (Ylikorkola ja Kauppila, 2003). Predetsidualisatsioonile järgneb raseduse tekkimise korral kinnituva blastotsüsti poolt vallandatud detsidualisatsioon. Stroomarakud toetavad blastotsüsti kinnitumist, luues kaitsemehhanisme oksüdatiivse stressi vastu. Näärmerakud täituvad lipiidide ja glükogeeniga, millest blastotsüst saab toitaineid ja kasvuks vajalikke ehitusmaterjale (Weimar jt, 2013; Sharma ja Kumar, 2012). Detsidualisatsiooni seostatakse ka leukotsüütide, eriti emakasiseste loomulike tapjarakkude (NK rakkude – *natural killer cells*) tõusuga emakalimaskestas. NK rakud omandavad unikaalse fenotüübi ja on võimalik, et nad on implantatsioonikoha põhilised regulaatorid. Nad ei lase emast geneetiliselt erinevat embrüot immuunrakkudel kahjustada ning indutseerivad veresoonte kasvu ja teisenemist (Weimar jt, 2013). Toimub veresoonte remodelleerimine – predetsidualisatsiooni käigus moodustunud spiraalarterioolid muunduvad vähese takistuse ja



suure mahtuvusega veresoonteks, mis kindlustavad tulevasse platsentasse katkematu verevoolu (Weimar jt, 2013).

Retseptiivse endomeetriumi morfoloogilised markerid on endomeetriumi epiteeli pindmise membraani väljasopistised – pinopoodid, mis tekivad progesterooni mõjul umbes menstruaaltsükli 21. päeval. See langeb kokku implantatsiooniaknaga ja pinopoodid püsivad aktiivsena kaks kuni kolm päeva (Sharma ja Kumar, 2012). Pinopoodidel on täheldatud ka pinotsütootilist funktsiooni, kuna nad imavad endasse vedelikku emaka valendikust ja seetõttu väheneb emakaõõne maht ning emakas olev blastotsüst on sunnitud emakalimaskestaga kontaktis olema. Pinopoodide tähtsaim funktsioon on embrüo-emaka kokkukasvamist takistava mutsiini eemaldamine (Fritz ja Speroff, 2011).

### **1.2.3 Vastuvõtliku endomeetriumi tähtsus kunstlikul viljastamisel**

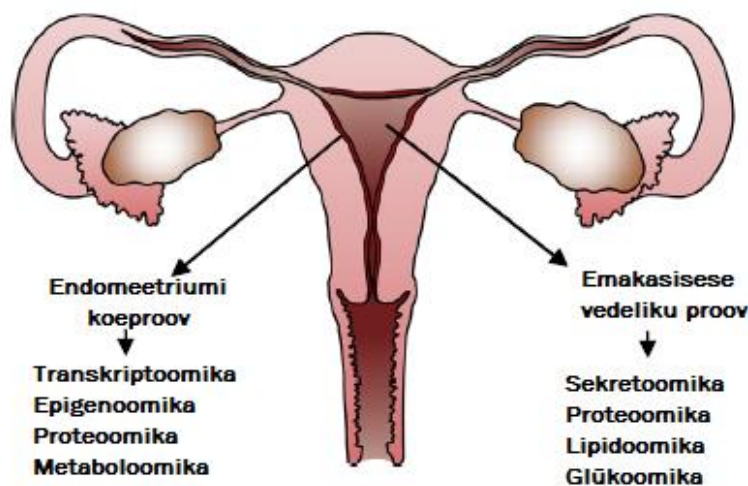
Õnnestunud implantatsiooniks on vajalik blastotsüsti ja endomeetriumi sünkroniseeritud suhtlus. Kuna endomeetriumi valmisolek blastotsüsti kinnitumiseks esineb suhteliselt lühikese perioodi jooksul, siis peetakse mittevastuvõtlikku endomeetriumi IVF protseduuride edukust vähendavaks. Samuti on kindlaks tehtud, et IVF-i käigus superovulatsiooni esile kutsumiseks kasutatavad hormoonteraapiad häirivad endomeetriumi koe normaalset arengut (Bourgain ja Devroey, 2003). Endomeetriumi sekretoorne faas võib lüheneda, mistõttu selle areng ei ole enam sünkroonis embrüo arenguga, viljatusravi saavate naiste endomeetriumi areng võib olla 1-3 päeva arengust eespool võrreldes normaalse tsükli endomeetriumi arenguga (Nikas jt, 1999). Vaatamata põhjalikele uurimistöödele ja pingutustele pole siiani tuvastatud markereid, mille põhjal saaksid reproduktiivspetsialistid usaldusväärselt hinnata endomeetriumi vastuvõtlikkust enne vajaliku ravi alustamist (Edgell jt, 2013). Usaldusväärsemate endomeetriumi seisukorra hindamise meetodite rakendamine kliinilises praktikas võimaldaks kehavälisel viljastamisel määrata personaalse embrüo siirdamise aja. Samuti oleks neist abi ka teadustöös selgitamaks erinevate ravimite ning haiguste mõju endomeetriumi vastuvõtlikkusele (Garrido-Gomez jt, 2013). Endomeetriumi vastuvõtlikkuse hindamismeetodite välja töötamiseks ja uuringuteks vajaliku kliinilise materjali ehk endomeetriumi koeproovide saamine on raskendatud, arvestades endomeetriumi dünaamilist olekut, kus rakuline ja molekulaarne koostis muutub igapäevaselt (Edgell jt, 2013).

### 1.3 ENDOMEETRIUMI VASTUVÕTLIKKUSE UURINGUD

Endomeetriumi vastuvõtlikkuse biomarkerid võimaldaksid määrata sobivaima implantatsiooniakna, mille tulemusena paraneksid viljatusravi tulemused (Garrido-Gomez jt, 2013).

1950. aastal kirjeldati, kuidas määrata histoloogiliste meetoditega endomeetriumi koest võetud biopsia abil naise menstruaaltsükli faase. Faas määratakse uurides spetsiifilisi morfoloogilisi muutusi ja tunnuseid endomeetriumi kihtides. Vaadeldakse näärmete ja epiteeli kuju ning suurust, mitootilist aktiivsust, tuumade suurust, sekreedi esinemist näärmevalendikus ning lümfotsüütide ja granulotsüütide esinemist (Noyes jt. 1950). Noyes jt poolt loodud kriteeriumid püsisid aastakümneid endomeetriumi retseptiivse staatuse määramisel, kuid nüüdseks on toodud välja mitmeid meetodi puuduseid (Ruiz-Alonso jt, 2012). Näiteks kasutati kriteeriumide välja töötamisel viljatute naiste endomeetriumi koeproove, mitte normaalse tsükliga naiste proove. Veel on välja toodud, et meetod on väga subjektiivne ja sõltub histoloogi interpretatsioonist, seetõttu võib histoloogi määratud ning tegelik menstruaaltsükli faas varieeruda kuni 2 päeva (Murray jt, 2004).

Alternatiivina Noyes'i klassikalisele histoloogilisele meetodile on käesoleval ajal leidnud kasutamist ka näiteks biokeemilised markerid, hormoonretseptorite ja immunohistokeemiliselt määratud biomarkerid. Neid ei ole aga diagnostilise meetodina kasutusele võetud (Diaz-Gimeno jt, 2011). Viimastel aastatel on põhiliselt kasutatud biomarkerite leidmiseks genoomika ja proteoomika põhised lähenemised ja on ka leitud mitmeid võimalikke kliiniliselt kasutatavaid biomarkereid. Järgneval joonisel on näidatud meetodid, mida on võimalik biomarkerite leidmiseks kasutada (Edgell jt, 2013).



**Joonis 5. Uute retseptiivsuse markerite leidmise võimalused** (Edgell jt, 2013) järgi. Endomeetriumi koeproovi ning emakasisese vedeliku proovi uurides on oluline arvestada menstruaaltsükli päeva ning seda, kas uuritaval esineb endomeetriumi häireid. Vastavaid proove saab analüüsida erinevate oomika meetoditega.

### 1.3.1 Vastuvõtliku endomeetriumi molekulaarsed markerid

Implantatsioon hõlmab erinevaid signaalradade sündmusi, mis on raseduse säilimiseks vajalikud. On kindlaks tehtud mitmed munasarja hormoonide poolt mõjutatavad molekulaarsed mediaatorid, mis osalevad embrüo ja ema vahelise ühenduse tekkes. Näiteks raku adhesiooni molekulid (CAM – *cell adhesion molecule*), tsütokiinid, kasvufaktorid ja lipiidid. (Simon jt, 2000; Lessey jt, 1992).

Tsütokiinid on raku valgulised signaalmolekulid, mida toodavad immuunrakud infektsioonipiirkonnas (Heinaru, 2012). Menstruaaltsükli jooksul osalevad tsütokiinid põletikusarnastes protsessides ning mõjutavad ovulatsiooni ja ka implantatsiooni. Endomeetrium toodab vähemalt kolme tsütokiini, mis on implantatsiooni seisukohalt tähtsad: kolooniat stimuleeriv faktor-1 (CSF-1 – *colony stimulating factor*), leukeemiat inhibeeriv faktor (LIF – *leukemia-inhibitory factor*) ja interleukiin-1 (IL-1 – *interleukin 1*). CSF-1 ekspressiooni ja tema retseptoreid on leitud implantatsioonieelsel ajal nii inimese endomeetriumist kui ka embrüost. Hiired, kellel on CSF-1 geenis inaktiveeriv mutatsioon, on ebaõnnestunud implantatsiooni ja madala embrüo ellujäämise tõttu viljatud (Fritz ja Speroff, 2011). IL-1 perekonna liikmed on immuunvastuse mediaatorid ning neid on leitud

emakalimaskesta strooma- ja näärmerakkudest terve menstruaaltsükli jooksul. IL-1 võib olla tähtis mediaator endomeetriumi rakkude omavahelisel suhtlusel (Simon jt, 1993; Achache ja Revel, 2006). Blastotsüsti poolt eritatud gonadotropiini vabastav hormoon stimuleerib IL-1 ekspressiooni (Fritz ja Speroff, 2011). LIF-i mõju implanatatsiooniprotsessile on uuritud hiirtel. Metsik-tüüpi hiire embrüod ei pesastunud selliste hiirte endomeetriumi, kellel oli LIF geen puudu (Stewart, 1994). LIF-i ekspressiooni on näidatud mitmel imetajal ning see on kõrgeim menstruaaltsükli 20. päeval (Achache ja Revel, 2006; Vogiagis jt, 1996).

Raku adhesioonimolekulid on rakkude pinnal asuvad valgud, mis soodustavad rakkudevahelise kontakti ehk adhesiooni kujunemist ja rakkude seostumist ekstratsellulaarse maatriksiga. CAM-valkude perekonda kuulub neli liiget: integriinid, kadheriinid, selektiinid ja immunoglobuliinid (Sharma ja Kumar, 2012). Integriinid on transmembraansed rakupinna retseptorid, mis osalevad adhesiooni etapis embrüo implantatsioonil (Fritz ja Speroff, 2011). Integriinid koosnevad  $\alpha$  ja  $\beta$  alaühikutest, mis võivad omavahel kombineeruda ja täita erinevaid ülesandeid. Inimese endomeetriumis ekspresseeritakse menstruaaltsükli 20.-24. päeval ehk WOI ajal kolme integriini:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ . Selektiinide ülesanne on vahendada leukotsüütide seondumist endoteeli rakkudega. Implantatsiooni seisukohast on tähtsaim L-selektiin (Achache ja Revel, 2006). Kadheriinid on kaltsiumiioonidest sõltuvad kinnitusliiduseid moodustavad valgud, mis seovad rakke kudede sees. Nad on jaotatud kolme alamklassi: N-kadheriinid, P-kadheriinid ja E-kadheriinid. E-kadheriine ekspresseerivad mitmed koed ja need mängivad tähtsat rolli embrüo arengus (gastrulatsioonis, neurulatsioonis ja organogeneesis). Hiire embrüotel tehtud uuringud näitavad, et mutatsioonid E-kadheriini geenis võivad põhjustada embrüol enne implantatsiooni arenguhäireid (Achache ja Revel, 2006).

Immunoglobuliinid on CAM-i perekonna kõige suurem rühm. Neid ekspresseeritakse leukotsüütide, fibroblastide, endoteeli ja epiteeli rakkude pinnal. Emakalimaskestas asuvad leukotsüüdid ekspresseerivad rakusisest adhesioonimolekuli 1 (ICAM-1). ICAM-1 võib blastotsüsti-endomeetriumi suhtlust mõjutada immuunsüsteemi kaudu. (Achache ja Revel, 2006).

### 1.3.2 Geeniekspressiooni uuringud

Viimase kümnendil on implantatsiooniakna biomarkerite leidmiseks kasutatud peamiselt transkriptoomika põhiseid meetodeid, kuna need võimaldavad analüüsida kõiki rakus või koes transkribeeritud RNA-sid (Haouzi jt, 2009). Mikrokiibi tehnoloogia abil saab üheaegselt analüüsida tuhandete geenide ekspressiooni. Uuritud on endomeetriumi koe geeniekspressiooni loomulikus menstruaaltsükli, munasarja stimulatsiooni tsüklites, endometrioosihaigetel ja viljatutel naistel (Horcajadas jt, 2007). Avaldatud uuringutes on välja toodud suur hulk gene, mille aktiivsus on inimese endomeetriumis implantatsiooni ajal suurenenud või vähenenud, kuid erinevate uuringute kattuvus on olnud väike (Haouzi jt, 2009).

Vaatamata sellele on endomeetriumi geeniekspressiooni profiili põhjal välja töötatud molekulaardiagnostiline vahend endomeetriumi retseptiivsuse hindamiseks. ERA<sup>®</sup> (*Endometrial Receptivity Array*) ehk endomeetriumi retseptiivsuse kiip on IGENOMIX'i poolt disainitud ja arendatud kohandatud mikrokiip, mis põhineb inimese retseptiivse endomeetriumi koe transkriptoomil. Endomeetriumi retseptiivse staatuse määramiseks analüüsitakse 238 geeni ekspressiooni. Need geenid on erinevalt ekspresseeritud erinevates menstruaaltsükli faasides. Analüüsi tegemiseks eraldatakse patsiendilt võetud emaka limaskestast koeproovist RNA ning see hübridiseeritakse kohandatud mikrokiibile (Garrido-Gomez jt, 2013). Kiibil on ka antud 238 geeni järjestused, mille puhul on teada, milline ekspressiooni muutus neil retseptiivses faasis olema peab. Hübridiseerimise järgselt kategoriseerib arvutiprogramm proovi ekspressiooniprofiili järgi kas retseptiivseks või mitteretseptiivseks.

ERA test on täpsem kui histoloogilised meetodid ning seda kasutatakse kliinilises diagnostikas implantatsiooniakna kindlakstegemiseks patsientidel, kellel on pealtnäha terve emakas ning normaalne endomeetriumi koe paksus, kuid embrüo implantatsioon ebaõnnestunud. Testiga määratakse patsiendil personaalne embrüo siirdamise aeg (Garrido-Gomez jt, 2013).

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks olid:

1. uurida endomeetriumi koe geeniekspressiooni RNA sekveneerimise abil.
2. leida uusi kandidaatgeene, mille ekspressioon muutub endomeetriumis implantatsiooniakna ajal.

### 2.2 MATERJAL JA METOODIKA

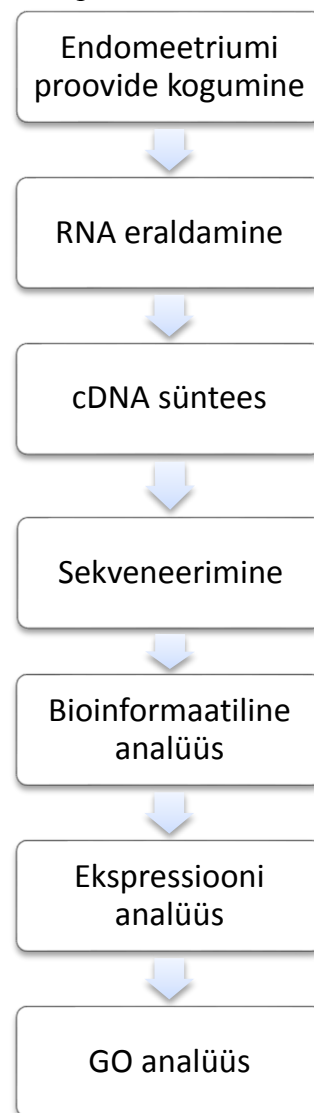
#### 2.2.1 Valimi kirjeldamine ja endomeetriumi koeproovid

Koostöös TÜ Kliinikumi ja Nova Vita Kliinikuga koguti 20 terve reproduktiivses eas naiste endomeetriumi biopsiad. Koeproovid pärinesid naisterahvastelt, kes olid vanuses 18-35 aastat ning loomulikult teel viljastunud ja sünnitanud vähemalt ühe lapse. Endomeetriumi koeproovid võeti valimisse kuulnud naisterahvastelt kahel korral, seega käesolevas töös uuriti kokku 40 biopsia materjali. Esimene proov võeti loomuliku menstruaaltsükli 2. ovulatsioonijärgsel päeval ehk kaks päeva pärast LH eritumise maksimumi. Teine proov võeti naistelt sama menstruaaltsükli 7.-8. ovulatsioonijärgsel päeval, mis vastas endomeetriumi implantatsiooniakna faasile ehk 21.-22. tsükli päevale. LH maksimumi päev tehti kindlaks LH-hormooni testi abil. Samuti teostati biopsiatele histoloogiline kontroll näitamaks, et proov vastab histoloogiliste markerite järgi soovitud tsükli päevale.

Antud uurimistöö toimus Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee loal. Uuritavad on andnud oma kirjaliku nõusoleku uuringus osalemiseks.

#### 2.2.2 RNA eraldamine

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati ~30 mg endomeetriumi kudet. Kude homogeniseeriti 700 µl QIAzol lüüsilahuses kasutades TissueRuptorit® (Qiagen, Hilden, Saksamaa) RNA eraldati miRNeasy Mini Kitiga (Qiagen, Hilden, Saksamaa)



kasutades tootja originaalprotokolli. Eraldatud RNA puhtust ja kontsentratsiooni kontrolliti NanoDrop™ 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, Wilmington, Ameerika Ühendriigid). Kvaliteedi hindamiseks kasutati Agilent 2100 Bioanalyzer'it (Agilent Technologies Inc., California, Ameerika Ühendriigid) koos Nano 6000 RNA kitiga (Agilent). cDNA raamatukogude sünteesiks kasutati proove, mille kvaliteedi indeks RIN (*RNA Integrity Number*) oli suurem või võrdne 8-ga.

### **2.2.3 cDNA raamatukogu koostamine ja RNA sekveneerimine**

Sekveneerimise katse läbiviimiseks valmistati esimese etapina cDNA raamatukogud. Raamatukogud valmistati vastavalt Illumina TruSeq Stranded RNA Kit'i (Illumina Inc., San Diego, California, Ameerika Ühendriigid) tootja juhistele, kasutades selleks ~1 µg RNA-d. Valmistatud raamatukogude kvaliteedi hindamiseks kasutati Agilent 2100 Bioanalyzer'it koos High Sensitivity DNA Kit'ga (Agilent Technologies Inc., California, Ameerika Ühendriigid). Seejärel mõõdeti raamatukogude kontsentratsiooni Qubit® 1.0 fluoromeetriga (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, Ameerika Ühendriigid). cDNA raamatukogud koostas juhendaja Marina Suhurutšenko.

RNA sekveneerimine teostati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklaboris kasutades Illumina HiSeq™ 2500 platvormi (Illumina Inc., San Diego, California, Ameerika Ühendriigid).

### **2.2.4 RNA sekveneerimisandmete analüüs**

RNA sekveneerimisandmete bioinformaatiline analüüs tehti Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi bioinformaatika õppetoolis Viktorija Kukuškina poolt. Sekveneerimisandmete esmaseks kvaliteedikontrolliks kasutati tarkvara FastQC (Babraham Bioinformatics). Seejärel programmide TrimOMaticu (versioon 0.32., Bolger jt, 2014) ja FastQC abil teostati adapterite trimmimine ning esmane fragmentide joondamine inimese referentsgenoomi (hg19/GRCh37) vastu kasutades TopHat tarkvara (Trapnell jt, 2009). Kasutades HTseq-count'i (versioon 0.6.1, Anders jt, 2014) leiti fragmentide arv mRNA kohta ning fragmendid joondati teist korda annoteeritud inimese referentsgenoomi (GRCh37.75) vastu. Vabavaralise statistikaprogrammi R (R Core Team, 2014, [www.R-project.org](http://www.R-project.org)) paketti EdgeR versiooni 3.6.2. (Robinson jt, 2010) kasutati diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide analüüsiks. Geeniontoloogia analüüsiks ja tulemuste visualiseerimiseks kasutati veebipõhist Panther Gene Analysis tarkvara (Thomas jt, 2003; <http://pantherdb.org>).

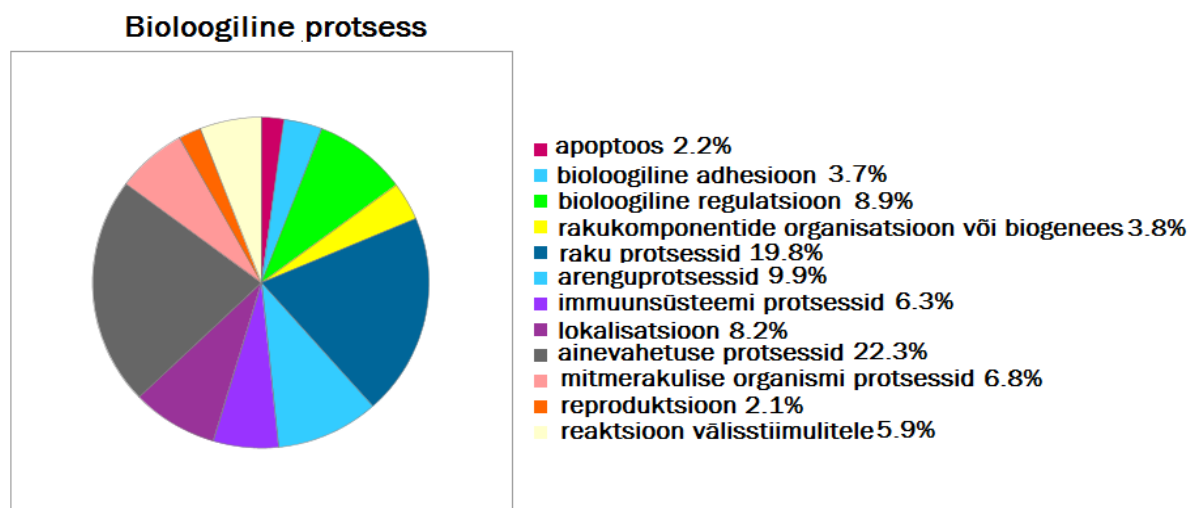
## 2.3 TULEMUSED

Sekveneerimise eksperimendi tulemusena saadi keskmiselt 94.4 miljonit fragmenti proovi kohta, millest 88.5 miljonit ehk 96.2% fragmentidest joondusid inimese referentsgenoomile.

EdgeR ekspressioonianalüüsi tulemusel saadi 2602 geeni, mille ekspressioon oli LH+8 faasis statistiliselt olulise muutusega võrreldes eelsekretoore ehk LH+2 faasiga. Nendest geenidest 1379 olid alla reguleeritud ning 1223 üles reguleeritud. Statistiliselt olulise geeniekspressiooni varieeruvuse hindamise kriteeriumiks oli FDR (*false discovery rate*)  $<0.05$ . FDR ehk valeavastuste määr on valepositiivsete avastuste osakaal kõigi avastuste seas.

Geeniontoloogia analüüsil tuvastati Panther Gene Analysis tarkvara kasutades 2602 diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide valimist 1578 geeni (Joonis 7), mis on seotud kokku 2885 bioloogilise protsessiga. Geeniontoloogia analüüsi tulemustest järeldeb, et enam kui 1000 geeni täpne molekulaarne funktsioon rakus on senini teadmata.

Reproduktiivprotsessides osalevaid geene tuvastati kokku 62 (Tabel 1). Nende geenide põhiliseks molekulaarseks funktsiooniks GO analüüsi järgi on valkude sidumine ning nad osalevad peamiselt järgmistes bioloogilistes protsessides: ainevahetus, rakkudevaheline kommunikatsioon ning välisstiimulitele reageerimine.



**Joonis 7. Annoteeritud geenide bioloogiline funktsioon.** Geeniontoloogia analüüsil tuvastati 2602 diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide valimist 1578 geeni mis on seotud kokku 2885 bioloogilise protsessiga. Sektordiagrammil on näidatud tuvastatud 1578 geeni bioloogilised funktsioonid ning nende jaotuvus.



## 2.4 ARUTELU

Viljatusravi edukusel on oluline roll vastuvõtlikul endomeetriumi ning seetõttu on oluline leida erinevaid biomarkereid, mille abil saaks objektiivselt hinnata endomeetriumi seisukorda. Käesolevas töös uuriti endomeetriumi geeniekspressiooni menstruaaltsükli eel-sekretoorses ning implantatsiooniakna faasis, et tuvastada retseptiivse endomeetriumi võimalikke biomarkereid.

Biomarkerite leidmiseks on kasutatud erinevaid tehnoloogiad, näiteks histoloogilisi meetodeid, proteoomikat ja endomeetriumi ultrasonograafiat. Siiani on põhiliseks meetodiks olnud endomeetriumi koostis transkribeeritud RNA-de uurimine mikrokiibi tehnoloogia abil (Haouzi jt. 2009). See põhineb tahkele kandjale kinnitatud proovi molekulide ning lahuses olevate sihtmärk-molekulide vahelisel hübriidsatsioonil ja võimaldab ühe eksperimendi käigus uurida tuhandete geenide ekspressiooni (Russo jt, 2003). Mitmetes mikrokiibiuuringutes on täheldatud geeniekspressiooni muutuseid inimese endomeetriumis, kui on omavahel võrreldud eelretseptiivset (LH+2) ja retseptiivset (LH+7 – LH+8) faasi (Carson jt, 2002; Riesewijk jt, 2003; Mirkin jt, 2005; Haouzi jt, 2009). Kuid nende uuringute tulemusel leitud potentsiaalsed biomarkerid langevad vähesel määral kokku ning tulemusi pole suudetud replitseerida sõltumatutes valimites. Selle põhjuseks võivad olla erinevused patsientide valimis ja proovide kogumises, väike analüüsitud proovide arv, erinevate mikrokiibi platvormide ning andmeanalüüsi programmide kasutamine, uuringu ülesehituse tehnilised iseärasused (Ulbrich jt, 2013; Ruiz-Alonso jt, 2012).

Diaz-Gimeno ja kolleegid analüüsisid mikrokiibi tehnoloogiat kasutades endomeetriumi proovide geeniekspressiooni oletatavas retseptiivses faasis ehk 7 päeva pärast luteiniseeriva hormooni eritumise maksimumi (LH+7). Seejärel võrreldi tulemusi eelretseptiivse faasi (LH+1) geeniekspressiooniga. Uurimuse põhjal arendati GENOMX'i (Valencia, Spain) poolt välja molekulaardiagnostiline vahend ERA® (*Endometrial Receptivity Array*) ehk endomeetriumi retseptiivsuse kiip, tänu millele on võimalik tuvastada vastuvõtlikku endomeetriumi (Diaz-Gimeno jt, 2011). ERA® põhineb 238 geeni retseptiivse faasi ekspressiooniprofiilil (Garrido-Gomez jt, 2013).

Käesoleva uurimistöö tulemuste ning ERA võrdlusel oli kattuvus 66.4%, 238-st ERA-s kasutatud geenist kattus meie tööga 158. Kuigi ERA on koostatud kasutades mikrokiibi tehnoloogiat ning antud töö puhul RNA sekveneerimist, siis on kattuvus siiski väike. Vähene

ülekate võib olla tingitud proovide varieeruvusest. ERA puhul võeti eel-sekretoorse ja retseptiivse endomeetriumi proovid erinevatelt indiviididelt vastavalt LH+1 ja LH+7 faasis. Antud töös aga võeti endomeetriumi biopsia ühel patsiendil kaks korda, sama menstruaaltsükli LH+2 ning LH+8 faasis.

Viimastel aastatel on mikrokiipide asemel hakatud kasutama RNA sekveneerimise tehnoloogiat, kuna selle abil on väiksemate kuludega võimalik korraga analüüsida miljoneid järjestusi (Fu jt, 2009). Mikrokiibi tehnoloogiaga võrreldes on RNA sekveneerimine tehniliselt paremini korratav, võimaldab saada täpsemat infot transkriptide ekspressioonitasemete kohta ning transkriptide detekteerimine ei ole limiteeritud ainult teadaolevate järjestustega (Vera jt, 2008; Nagalakshmi jt, 2008). Esimene RNA sekveneerimisel põhinev endomeetriumi geeniekspressiooni uuring avaldati 2014. aastal (Hu jt, 2014), kus nagu ka käesolevas töös võrreldi endomeetriumi transkriptoomi eel-retseptiivses ning retseptiivses faasis. Hu jt. avaldasid 4 geeni, mida ei ole varasemates töödes seostatud endomeetriumi vastuvõtlikkusega, kuid mis olid olulise ekspressioonimuutusega oletatava WOI ajal. Nendeks on *HAP1*, *ZCCHC12*, *MRAP2* ja *OVGP1* (Hu jt, 2014). Käesolevas töös tuvastati neist kolm - *HAP1*, *MRAP2* ja *OVGP1*. Kattuvus näitab meie geenandmete usaldusväärsust.

*HAP1* (*huntingtin-associated protein 1*) geeni ekspressiooni on näidatud põhiliselt inimese kesknärvisüsteemis. *HAP1* kodeeritud valk interakteerub huntingtiiniga ning osaleb Huntingtoni tõve kujunemisel (Wu jt, 2009). *HAP1* on potentsiaalne rinnavähi biomarker, kasvajakudedes on geeni ekspressioonitase märgatavalt madalam kui normaalses koes. Rinnavähi rakuliinides näidati, et *HAP1* ülesreguleerimisel väheneb kasvajakude kasv ning paljunemisvõime (Zhu jt, 2013). Li, X. jt poolt teostatud uurimistöös selgus, et *HAP1* osaleb ka vesikulaarses transpordis. On võimalik, et *HAP1* aitab sekretoorsesse endomeetriumi makromolekule eritada (Li jt, 2005; Hu jt, 2014).

*MRAP2* (*melanocortin 2 receptor accessory protein 2*) on seotud metaboolsete protsessidega ja energiaallikate homöostaasi säilitamisega. Inimesel ning hiirel teostatud uuringute põhjal on *MRAP2* seotud rasvumisega (Asai jt, 2013).

*OVGP1* (*oviductal glycoprotein 1*) kodeerib süsivesikuterikast glükoproteiini, mida sekreteeritakse munajuha epiteeli rakkudest. Geeniekspressiooni maksimum on ovulatsiooni ajal ja ekspressiooni regulatsioon võib olla östrogeenist sõltuv (Lok jt, 2002). *OVGP1* saab seonduda ovuleerunud munarakkude, blastomeeride ja spermidega ning võib mängida rolli

viljastumisel ja varajase embrüo arengus (Aviles jt, 2010). Antud uuringus oli *OVGP1* LH+8 faasis alla reguleeritud ( $\log_{2}FC = -4,15$ ).

Varasemalt on näidatud *HOXA10* ekspressiooni varieeruvust menstruaaltsükli jooksul ning märgatavat tõusu WOI ajal (Taylor jt, 1998; Troy, 2003). Samuti on kirjeldatud *HOXA10* ekspressiooni olulisust vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel ja pinopoodide arengul (Bagot jt, 2001). Käesolevas töös ei tuvastatud *HOXA10* geeniekspressiooni muutusi, S. Hu jt uurimuses oli *HOXA10* oluliselt alla reguleeritud.

Hu jt sekveneerimise uuringus moodustati ka geeniekspressiooni profiili ning GO analüüsi tulemusi kasutades geenide koekspressiooni võrgustikud ning toodi välja veel 5 potentsiaalset markergeeni - *GLI2*, *CDC25A*, *TLR9*, *SLC5A1* ja *MTIG*. Antud töös täheldati geeniekspressiooni muutust ainult *CDC25A* geeni puhul, mis on oluline rakutsükli regulaator ning mille alla-regulatsioon sekretoorses faasis võib vähendada endomeetriumi proliferatsiooni.

Hu ja kolleegide töös tuvastati kokku üheksa uut biomarkeri kandidaati. Välja toodud üheksast biomarkeri kandidaadist oli käesolevast töös statistiliselt olulise ekspressioonimuutusega neli geeni. Tulemuste lahknevus võib tulla sellest, et sekretoorse faasi proovid olid võetud vastavalt LH+8 või LH+7 tsükli päeval. Kuna endomeetrium muutub menstruaaltsükli jooksul pidevalt, siis võib ka ühe päeva möödudes geeniekspressioon muutuda. Samuti ei võetud Hu jt uurimuses tsükli faaside proove samadelt isikutelt, mis võib samuti suurendada tulemuste varieeruvust.

Diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide GO analüüsi tulemuste järgi osaleb reproduktiivprotsessides 62 geeni, mis on toodud tabelis 1. Nende geenide põhiliseks molekulaarseks funktsiooniks on valkude sidumine ning nad osalevad peamiselt järgmistes bioloogilistes protsessides: ainevahetus, rakkudevaheline kommunikatsioon ning välisstiimulitele reageerimine.

Eelmainitud 62-st geenist oli suurima ekspressioonimuutusega *GPR110* (*G protein-coupled receptor 110*) ( $\log_{2}FC=8.87$ ,  $FDR= 7.76 \times 10^{-30}$ ). Keskmisest kõrgem *GPR110* ekspressioon on leitud vanemate doonorite neeru- ning eesnäärme koes, suurem üleekspressioon aga inimese kopsu- ning eesnäärmevähi puhul (Lum jt. 2010). Varasemalt pole *GPR110* seost endomeetriumi kirjeldatud. GO analüüsist tuleneb, et *GPR110* on seotud spermatogeneesi, immuunvastuse kujunemise, neurotransmitterite sekretsiooni, vesiikul-transpordi ning

rakkudevahelise kommunikatsiooniga. Kuna immuunvastus ja rakkudevaheline suhtlus on vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel väga olulised, on GPR110 võimalik biomarker.

*BCL2L10* (*BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)*) molekulaarseks funktsiooniks on valkude sidumine. GO analüüsi järgi osaleb *BCL2L10* rakkudevahelises suhtluses ja stressivastuse kujunemisel. Samuti on näidatud *BCL2L10* osalust nii nais- kui meessugurakkude arengus ning geeni üleekspressioon surub alla apoptoosi. Kirjanduses on uuritud *BCL2L10* ekspressiooni inimese munarakus ning reesusahvi preimplantatsioonilises embrüos ja geen on välja pakutud kui munaraku ning embrüo kvaliteedimarker (Guillemin jt, 2009). Antud uurimuses oli retseptiivses faasis *BCL2L10* ekspressioon võrreldes eelsekretoorse faasiga tunduvalt suurenenud ( $\log_{2}FC=5.18$ ,  $FDR=1.7 \times 10^{-7}$ ). *BCL2L10*-i ekspressioonimuutuse ja kirjanduse andmete põhjal on geen võimalik retseptiivse endomeetriumi biomarker.

**Tabel 1. Sekveneermisandmete ning GO analüüsi tulemusel leitud reproduktiivprotsessides osalevad geenid.**

Geeni nimi	logFC	FDR	Geeni nimi	logFC	FDR
GPR110	8,866608719	7,76E-30	B3GNT5	-1,231771292	0,006326879
BCL2L10	5,176608437	1,70E-07	DNAH11	-1,282648651	0,001127495
CRISP3	4,193612915	0,000000002	HOXB4	-1,312467736	0,028295494
B3GNT3	3,613395961	0,005343576	TSPAN13	-1,416656489	0,045961714
TSPAN8	3,276839795	0,000003018	TSPAN11	-1,449230675	0,005702768
TMPRSS13	3,12491966	0,002784146	PRKCQ	-1,75147159	0,000282993
TSPAN15	2,644679336	0,006816392	ADAM12	-1,918424689	2,88E-05
INHBB	2,396850707	0,024055114	KHDRBS3	-1,940009966	0,004953436
TMPRSS4	2,197141407	5,54E-05	INHBE	-2,086500573	1,01E-05
C1R	2,13238019	8,44E-11	MAGEE1	-2,155480239	0,03851737
TGFB2	2,017256638	0,036608719	ADAMTS16	-2,278482092	0,000562194
C1S	2,014724842	1,08E-05	KSR2	-2,309637039	0,018630156
DZIP1	1,759487585	1,17E-08	SFRP1	-2,34418953	0,008296522
B3GNT9	1,617154455	0,000793492	HOXA13	-2,359664083	0,047649631
TSPAN12	1,554907788	0,018319319	B3GALT1	-2,365793131	0,015157353
CTNNB1	1,482207388	4,28E-06	CRISPLD1	-2,402705103	0,000402092
SIK2	1,450590386	0,001300999	PLCZ1	-2,456299	3,10E-05
STAR	1,439549929	0,016060939	CCNB1	-2,503599126	0,000227905
CALCRL	1,33145553	0,040260353	TMPRSS11F	-2,522275917	0,01673781
DNAJB5	1,272352438	0,001874037	INHBC	-2,636007783	1,53E-06
LIPI	1,197249822	0,030384388	ADAM7	-2,746872309	0,00531673
C1RL	1,105876584	0,017981605	HOXD13	-2,755595706	0,017285471
LIMK2	0,814845309	0,046253686	ADAM29	-2,759509022	0,000122006
SBF2	0,814323561	0,01030676	TOP2A	-2,934390806	2,45E-07
MAP3K13	0,773580773	0,030521668	FCGBP	-3,102109475	0,018534634
ZFHX3	-0,838247501	0,005496196	PTH2R	-3,314381745	0,000320432
CCND1	-0,885570165	0,047161523	KLK3	-3,645959621	0,004282541
HOXB3	-0,987051888	0,003179245	KLK4	-3,797439204	2,42E-08
HOXA11	-1,009186235	0,007516727	SFRP4	-3,976808811	1,90E-14
KDM4A	-1,15756765	0,030521668	KLK2	-4,662577102	1,77E-15
MAGED1	-1,203783848	0,014793246	ADCYAP1R	-4,781723308	2,51E-13

## KOKKUVÕTE

Viljatuse raviks on võimalik kasutada IVF-i, kuid siirdatud embrüote emakasse implanteerumise efektiivsus on kõigest 25%. Ebaõnnestunud implantatsiooni põhjuseks on 2/3 juhtudest mittevastuvõtlik endomeetrium. Endomeetriumi geeniekspressiooni uuringute abil on võimalik leida geene, mis osalevad vastuvõtliku endomeetriumi kujunemisel. Saadud teadmisi saab kasutada IVF edukuse suurendamiseks.

Antud töö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse naisepoolse viljatuse põhjuseid ning viljatuse diagnoosimist ja ravimeetodeid. Lisaks antakse ülevaade endomeetriumi ja vastuvõtlikkuse kujunemisest ning tähtsusest. Välja on toodud ka vastuvõtliku endomeetriumi molekulaarsed markerid ja varasemad ekspressiooniuuringud. Käesoleva töö eksperimentaalse eesmärgiks oli uurida endomeetriumi geeniekspressiooni eelsekretoorses ja implantatsiooniakna faasis RNA sekveneerimise meetodil ning leida uusi kandidaatgeene, mille ekspressioon muutub endomeetriumis implantatsiooniakna ajal.

Töö tulemusena tuvastati 2602 geeni, mille ekspressioon oli implantatsiooniakna ajal statistiliselt olulise muutusega võrreldes eelsekretoore ehk LH+2 faasiga. Varasemas RNA sekveneerimise uuringus välja toodud üheksast implantatsiooniakna kandidaatgeenist kattus meie tööga neli: *CDC25A*, *HAP1*, *MRAP2* ja *OVGP1*. Kattuvus toetab meie ekspressiooniandmete usaldusväärsust. Kirjanduse ja ekspressiooniandmete põhjal leidsime 2 uut retseptiivse endomeetriumi kandidaatgeeni - *BCL2L10* ja *GPR110*.

RNA sekveneerimise abil on võimalik edukalt uurida endomeetriumi geeniekspressiooni ning leida võimalikke retseptiivse endomeetriumi biomarkereid, kuid kliinilise tähtsusega biomarkerite leidmiseks on vajalikud edasised uuringud, kus on kehtestatud ühtsed eksperimendi läbiviimise tingimused.

# **Female infertility: the role of gene regulation in achieving endometrial receptivity**

Liis Mägi

## **SUMMARY**

Infertility is defined as failure to achieve pregnancy after 12 months of regular unprotected intercourse. Assisted reproduction methods are widely used in infertility treatment, but the limiting factor in achieving pregnancy for most couples is implantation. Only around 25% of transferred embryos will successfully implant into the uterus. Inadequate uterine receptivity is responsible for approximately two-thirds of implantation failures. Identification of biomarkers assessing endometrial receptivity by studying gene expression in human endometrium may help in improving the outcome of ART methods.

In this study, I give an overview of a) common causes of female infertility and diagnostic evaluation and treatment options for infertility, b) endometrial receptivity and its molecular markers and c) previous gene expression studies. The aim of this thesis was to study gene expression changes during early to mid-secretory transition in endometrium by RNA sequencing and to identify genes, which could be used as potential biomarkers for assessing receptivity in the endometrium.

The study showed that 2602 genes are differentially expressed during window of implantation (LH+8) compared to mid-secretory phase (LH+2) of menstrual cycle. Previous RNA sequencing study reported nine novel biomarkers of endometrial receptivity, from which *CDC25A*, *HAP1*, *MRAP2* ja *OVGP1* were differentially expressed in our study. These results positively support the reliability of our gene expression data. We identified 2 novel potential endometrial receptivity biomarkers by comparing our gene expression data to available literature.

RNA sequencing can be effectively used to study endometrial gene expression and to determine novel biomarkers of endometrial receptivity. But further studies with uniformed terms of experiments and data analysis will be required to prove their clinical utility.

## **TÄNUAVALDUSED**

Tahan tänada oma juhendajaid Marina Suhorutšenkot ja Margit Nõukast igakülgse abi, toetuse ja nõuannete eest.

Avaldan tänu ka TÜ Kliinikumi, Nova Vita Kliiniku ja Eesti geenivaramu tuumiklabori kollektiivile ning Viktorija Kukuškinale, kes osalesid antud töös kirjeldatud uurimuses.

Tänan oma perekonda ja lähedasi mõistva suhtumise ja innustuse eest.



- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 59:2–11.
- Alio, A.P., Salihu, H.M., McIntosh, C., August, E.M., Weldeselasse, H., Sanchez, E., Mbah, A.K. (2012). The effect of paternal age on fetal birth outcomes. *Am J Mens Health.* 6:427–35.
- Anders, S., Pyl, T.P., Huber, W. (2014). HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*
- Asai, M., Ramachandrapa, S., Joachim, M., Shen, Y., Zhang, R., Nuthalapati, N., Ramanathan, V., Strohlic, D.E., Ferket, P., Linhart, K., Ho, C., Novoselova, T.V., Garg, S., Ridderstrale, M., Marcus, C., Hirschhorn, J.N., Keogh, J.M., O’Rahilly, S., Chan, L.F., Clark, A.J., Farooqi, I.S., Majzoub, J.A. (2013). Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science.* 341:275–278.
- Aviles, M., Gutierrez-Adan, A., Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod.* 16: 896–906.
- Bagot, C.N., Kliman, H.J., Taylor, H.S. (2001). Maternal Hoxa10 is required for pinopod formation in the development of mouse uterine receptivity to embryo implantation. *Dev Dyn:* 222: 538–544.
- Bellver, J., Pellicer, A., García-Velasco, J., Ballesteros, A., Remohí, J., Meseguer, M. (2013). Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril.* 100(4): 1050-1058
- Biggers, J.D. (2012). IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reprod Biomed Online.* 25:118–27.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., Nygren, K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 22(6): 1506–12.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*
- Bourgain, C., Devroey, P. (2003). The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update.* 9: 515-522.

- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., Saad, A. (2011). The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet.* 28:425–32.
- Bulun, S.E. (2009). Endometriosis. *N Engl J Med.* 360: 268-279.
- Carson, D.D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M.C., Vernon, M., Yuan, L., Fritz, M.A., Lessey, B. (2002). Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 8: 871–879.
- Cha, J., Sun, X., Dey, S.K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Med.*18: 1754–1767.
- de la Rochebrochard E., Thonneau P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 17(6):1649- 56
- Dey, S. (2010). How we are born. *J Clin Invest.*120(4): 952-955.
- Diaz-Gimeno, P., Horcajadas, J.A., Martinez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Alam, P., Pellicer, A., Simon, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial
- Du, H., Taylor, H.S. (2009). Stem cells and female reproduction. *Reprod Sci.* 16(2): 126-39.
- Edgell, T.A., Rombauts, L.J.F., Salamonsen, L.A. (2013). Assessing receptivity in the endometrium: the need for a rapid, non-invasive test. *Reprod Biomed Online.* 27: 486–496
- Edmonds, D.K. (2012). Infertility, p. 567-579. *In Dewhurst's Textbook of Obstetrics and Gynaecology*, 8<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell, Inglismaa.
- Edwards, R.G. (2005). Historical significance of gonadotrophins in assisted reproduction. *Reprod BioMed Online.* 10: 3
- Fadhlaoui, A., de la Jolinière, D.B., Feki, A. (2014). Endometriosis and infertility: how and when to treat? *Front Surg.* 1: 24.
- Ferraretti, A.P., Goossens, V., de Mouzon, J., Bhattacharya, S., Castilla, J.A., Korsak, V., Kupka, M., Nygren, K.G., Nyboe Andersen, A. (2012). Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 27:2571–84.
- Forti, G. Krausz, C. (1998). Clinical review 100 Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 4177-4188
- Fritz, M.A., Speroff, L. (2011). Reproductive physiology p. 1-329; Infertility, p.1135 - 1849. *In Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 8<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.

- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Chen, W., Li, Y., Zeng, R. (2009). Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC Genomics* 10: 161.
- Garrido-Gomez, T., Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Diaz-Gimeno, P., Vilella, F., Simon, C. (2013). Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril*. 99:1078–85.
- Gelbaya, T.A., Potdar, N., Jevé, Y.B., Nardo, L.G. (2014). Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 69(2): 109-15.
- Gill, J. (2000). The effects of moderate alcohol consumption on female hormone levels and reproductive function. *Alcohol*. 35: 417–423.
- Gormack, A.A., Peek, J.C., Derraik, J.G.B., Gluckman, B.D., Young, N.L. Cutfield, W.S. (2015). Many women undergoing fertility treatment make poor lifestyle choices that may affect treatment outcome. *Hum Reprod.* doi:10.1093/humrep/dev094
- Guillemin, Y., Lalle, P., Gillet, G., Guerin, J.F., Hamamah, S., Aouacheria, A. (2009). Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10. *J Mol Med.* 87:923–940
- Haller-Kikkatalo, K., Salumets, A., Uibo, R. (2012). Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone. *Clin Dev Immunol.* 2012:762541
- Haller-Kikkatalo, K., Sarapik, A., Salumets, A., Uibo, R. (2009). Autoimmuunsus ja naise viljatus I. Soodumus autoimmuunsete reaktsioonide tekkeks. *Eesti Arst*; 88:14–9.
- Haouzi, D., Mahmoud, K., Fourar, M., Bendhaou, K., Dechaud, H., De Vos, J., Reme, T., Dewailly, D., Hamamah, S. (2009). Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 24: 198–205.
- Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C. (2007). Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update.* 13(1): 77-86
- Hull, M.G., North, K., Taylor, H., Farrow, A., Ford, W.C. (2000). Delayed conception and active and passive smoking. The Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood Study Team. *Fertil Steril.* 74:725
- Jose-Miller, A.B, Boyden, M.D., Frey, K.A. (2007). Infertility. *Am Fam Physician.* 75(6): 849-856.

- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Uro.* 62: 324–32.
- Kalinina, A., Matt, K. (2003). Autoantikehade osa naise viljatuse tekkes. *Eesti Arst.* 82:172-6.
- Kanis, J.A., Stevenson, J.C. (1994). Effect of estrogen therapy on bone density in elderly women. *N Engl J Med.* 330:715–16.
- Kelkar, R.L., Meherji, P.K., Kadam, S.S., Gupta, S.K., Nandedkar, T.D. (2005). Circulating auto-antibodies against the zona pellucida and thyroid microsomal antigen in women with premature ovarian failure. *J Reprod Immunol.* 66(1): 53–67
- Klein, S.M., García, C.R. (1973). Asherman's syndrome: a critique and current review. *Fertil Steril.* 24(9):722-35.
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25: 271–85.
- Laird, S.M., Tuckerman, E.M., Li, T.C. (2006). Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod BioMed Online* 13:13–23.
- Lapp, E. (2013). Kehavälise viljastamise ebaedu põhjused: suguteede põletikud, tervislik seisund ja tervisekäitumine mõlemal partneril. TÜ, Tervishoiu instituut.
- Lédée-Bataille, N., Laprée-Delage, G., Taupin, J.L., Dubanchet, S., Frydman, R., Chaouat, G. (2002). Concentraion of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predicitive of embryo implantation. *Hum Reprod.* 17: 13–218
- Lessey, B.A. (2010). Fine tuning of endometrial function by estrogen and progesterone through microRNAs. *Biol Reprod.* 82:653–5.
- Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S.M., Buck, C.A. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* 90: 188–195.
- Li, X.J., Li, S.H. (2005). HAP1 and intracellular trafficking. *Trends Pharmacol Sci.* 26(1):13.
- Li, Y., Lin, H., Li, Y., Cao, J. (2011). Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril.* 95: 116–23.
- Lok, I.H., Briton-Jones, C.M., Yuen, P.M., Haines, C.J. (2002). Variable expression of oviductin mRNA at different stages of human reproductive cycle. *J Assist Reprod Genet.* (12): 569-76.

- Lum, A.M., Wang, B.B., Beck-Engeser, G.B., Li, L., Channa, N., Wabl, M. (2010). Orphan receptor GPR110, an oncogene overexpressed in lung and prostate cancer. *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-10-40.
- Macas, E., Floersheim, Y., Hotz, E., Imthurn, B., Keller, P.J., Walt, H. (1990). Abnormal chromosomal arrangements in human oocytes. *Hum Reprod*. 5(6):703-7
- March, C.M. (1995). Intrauterine adhesions. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 22(3): 98–103.
- Margalioth, E.J., Ben-Chetrit, A., Gal, M., Eldar-Geva, T. (2006). Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF–ET. *Hum Reprod* 21: 3036–43
- Marieb, E., Hoehn, K. (2010). The Reproductive System, p.1045. *In Human anatomy & physiology*, , 8<sup>nd</sup> ed. Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Maroulis, G. B. (1997). Ovarian Aging. *Ann. NY. Acad. Sci*. 816: 22–26
- Martini, F.H., Bartholomew, E.F., Ober, W.C. (2013). The reproductive system, chapter 19. *In Essentials of anatomy & physiology*, 6<sup>th</sup> ed. Pearson, Boston.
- Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S., Stevens, G.A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 9:e1001356.
- Mirkin S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J.I., Williams, S., Bocca, S., Oehninger, S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod*. 20: 2104–2117.
- Moskovtsev, S.I., Willis, J., Mullen, J.B. (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril*. 85: 496–9.
- Murray, M.J., Meyer, W.R., Zaino, R.J., Lessey, B.A., Novotny, D.B., Ireland, I., Fritz, M.A. (2004). A critical reanalysis of the accuracy, reproducibility and clinical utility of histologic endometrial dating: a systematic study of the secretory phase in normally cycling, fertile women. *Fertil Steril*. 81: 1333
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 320: 1344-1349.
- Nagy, E., Nagy, B. (2015). Coping with infertility: Comparison of coping mechanisms and psychological immune competence in fertile and infertile couples. *J Health Psychol*. doi: 10.1177/1359105314567206
- Nikas, G., Develioglu, O.H., Toner, J.P., Jones, H.W. Jr. (1999). Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod*. 14: 787–92

- Noyes, R.W., Hertig, A.W., Rock, J. (1950). Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril*.1: 3
- Ponnampalam, A.P., Weston G.C., Trajstman A.C., Susil, B., Rogers, P.A.W. (2004) Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*. 10(12): 879–893
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online*. 4: 591-602
- Reimand, K., Talja, I., Metsküla, K., Kadastik, Ü., Matt, K., Uibo, R. (2001). Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *J. Reprod. Immunol*. 51(2):167–176
- Riesewijk, A., Martin, J., van Os, R., Horcajadas, J.A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S., Simon, C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH\_2 versus LH\_7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*. 9: 253–264.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. (2010). EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26: 1
- Ross, M.H., Pawlina, W. (2011). *In Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, 6<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Simón, C. (2012). The genomics of the human endometrium. *Biochim Biophys Acta*.1822(12): 1931–1942
- Russo, G., Zegar, C., Giordano, A. (2003). Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*. 22: 6497–6507.
- Sarapik, A., Haller-Kikkatalo, K., Utt, M., Teesalu, K., Salumets, A., Uibo R. Serum anti-endometrial antibodies in infertile women—potential risk factor for implantation failure. (2010). *Am J Reprod Immunol*. 63(5):349–357
- Seracchioli, R., Trevisi, M., Ferlini, F., Petracchi, S., Colombi, C., Borini, A., Balicchia, B. and Porcu, E. (1997). Laparoscopic surgery and assisted reproductive techniques combined strategies of therapy in infertile women. *Ann. N Y Acad Sci*. 26: 316-325.
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V., Assidi, M., Abu-Elmagd, M. and Turki, R. (2015). Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol*. 13(1)
- Simoens, S., Dunselman, G., Dirksen, C., Hummelshoj, L., Bokor, A., Brandes, I., Brodsky, V., Canis, M., Colombo, G., DeLeire, T., Falcone, T., Graham, B., Halis, G., Horne, A., Kanj, O., Kjer, J., Kristensen, J., Lebovic, D., Mueller, M., Vigano, P., Wulschleger, M. and D'Hooghe, T. (2012). The burden of endometriosis: costs and

- quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum. Reprod.* 27(5): 1292-1299.
- Simon, C., Martin, J.C., Pellicer, A. (2000). Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* .14: 815–826.
- Simon, C., Moreno, C., Remohi, J., Pellicer, A. (1998). Cytokines and embryo implantation *J. Reprod Immunol.* 39: 117–131
- Simon, C., Piquette, G.N., Frances, A., Polan, M.L. (1993). Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 549–555.
- Spencer, T.E., Hayashi, K., Hu, J., Carpenter, K.D. (2005). Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol.* 68: 85-122
- Stephote, P.C., Edwards, R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 2: 366
- Stewart, C.L. (1994). Leukaemia inhibitory factor and the regulation of preimplantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 39: 233–238.
- Sõritsa A., Levkov L., Ott P. (1997). Esimene sünnitus Eestis munarakudoonorluse tulemusena. *Eesti Arst.* 1:22–5
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Lancaster, P., Mansour, R., Sullivan, E. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertil Steril.* 92:1520–4.
- Zhu, L., Song, X., Tang, J., Wu, J., Ma, R., Cao, H., Ji, M., Jing, C., Wang, Z. (2013). Huntingtin-associated protein 1: a potential biomarker of breast cancer. *Oncol Rep.* 29(5): 1881-7.
- Tamm, K., Suhorutšenko, M., Talving, E., Kaljas, A., Metsis, M. (2012). Suguhormoonide oestradioli ja progesterooni koospetsiifi line roll inimese endomeetriumis ja rinnanaarmes. *Eesti Arst.* 91(4):182–189
- Taylor, H.S., Arici, A., Olive, D., Igarashi, P. (1998). HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest.* 101:1379–1384.
- Teede, H., Deeks, A., Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 8: 41

- Templeton, A., Morris, K.J., Parslow, W. (1996). Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*. 348: 1402–1406
- The ESHRE Capri Workshop Group. (2002). Physiopathological determinants of human infertility. *Hum Reprod Update*. 8: 435–47.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2008). Obesity and reproduction. *Fertil Steril*. 90(5): S21
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2015). Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.03.019
- Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*. 13: 2129-2141
- Tolstrup, J.S., Kjaer, S.K., Holst, C., Sharif, H., Munk, C., Osler, M., Schmidt, L., Andersen, A.M., Gronbaek, M. (2003). Alcohol use as predictor for infertility in a representative population of Danish women, *Acta Obstet Gynecol Scand*. 82:744
- Tournaye, H. (2012). Male factor infertility and ART. *Asian J Androl*. 14(1): 103–108
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 25(9): 1105-1111
- Troy, P.J., Daftary, G.S., Bagot, C.N., Taylor, H.S. (2003). Transcriptional repression of peri-implantation EMX2 expression in mammalian reproduction by HOXA10. *Mol Cell Biol*. 23: 1–13.
- Ulbrich, S.E., Groebner, A.E., Bauersachs, S. (2013). Transcriptional profiling to address molecular determinants of endometrial receptivity – lessons from studies in livestock species. *Methods*. 59:108-115.
- Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B. ja Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 25(6): 861-873
- Van Voorhis, B.J., Stovall, D.W. (1997). Autoantibodies and infertility: a review of the literature. *J Reprod Immunol*. 33(3): 239–56.
- Vaskivuo, T.E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., te Velde, E.R., Stenback, F., Heikinheimo, M., Tapanainen, J.S. (2001). Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis related proteins, and transcription factor GATA-4. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86: 3421



- Waylen A.L., Metwally, M., Jones, G.L., Wilkinson, A.J., Ledger, W.L. (2009). Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 15: 31–44
- Vera, J. C., Wheat, C. W., Fescemyer, H. W., Frilander, M. J., Crawford, D. L., Hanski, I., & Marden, J. H. (2008). Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Mol Ecol*. 17: 1636-1647.
- Vogiagis, D., Marsh, M.M., Fry, R.C., Salamonsen, L.A. (1996). Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 148: 95–102.
- Wu, L.L., Zhou, X.F. (2009). Huntingtin associated protein 1 and its functions. *Cell Adh Migr*. 3: 71–76.
- Ylikorkala, O., Kauppila, A. (2008). Menstruaaltsükli hormonaalne regulatsioon p. 26-48; Lastetus p. 177-196. *Sünnitusabi ja günekoloogia*. Tallinn: Medicina

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

<https://www.riigiteataja.ee/akt/126022015004> (16.05.2015) - Kunstliku viljastamise ja embrüokaitse seadus, RT I 1997, 51, 824 ... RT I, 26.02.2015, 4

<https://www.qiagen.com/> (15.05.2015)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (20.05.2015)

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (24.05.2015)

<http://pantherdb.org/> (1.05.2015-24.05.2015)

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Liis Mägi (05.09.1993),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Naisepoolne viljatus: geeniregulatsiooni roll endomeetriumi vastuvõtlikkuse kujunemisel,**“ mille juhendajad on Marina Suhorutšenko ja Margit Nõukas
- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015